

**Konstruktion eines Perfusions-Systems zur metabolischen Untersuchung
lebender Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 und der
humanen neuralen Stammzelllinie ReNCX unter variabel regulierbaren
Rahmenbedingungen mittels hochauflösender
Kernspinresonanzspektroskopie**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR.
RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT
REGENSBURG

vorgelegt von

Christian Dobner

aus Regensburg

im Jahr 2017

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

03.07.2017

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Hans Robert Kalbitzer

Unterschrift:

Dipl.-Phys. Christian Dobner

Inhalt

1	Einleitung.....	7
2	Theoretische Grundlagen	10
2.1	Relaxation und T_2 -gewichtete Spektren	10
2.2	Diffusions-gewichtete Spektren und Diffusionskoeffizient	13
2.3	pH-Bestimmung durch Henderson-Hasselbalch Gleichung.....	14
2.4	Zellmetabolismus.....	16
2.4.1	Glioblastome und Tumorzellmetabolismus.....	16
2.4.2	Stammzellen und Stammzellmetabolismus	19
2.4.3	Makromolekulare Resonanzen im ^1H -NMR-Spektrum.....	21
2.4.3.1	Mobile Lipide	21
2.4.3.2	Mobile Proteine.....	23
2.5	Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und dessen Behandlung mit einem Antisense Oligonukleotid.....	24
2.6	Aminosäuren.....	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Aufbau des Perfusions-Systems.....	27
3.1.1	Materialien des Leitungssystems	28
3.1.2	Inkubator	30
3.1.3	Peristaltik-Pumpe	30
3.1.4	Perfusionskammer.....	31
3.1.5	Sauerstoff- und Temperatursensoren	32
3.1.6	Sensoranordnung und Injektionseinheit	33
3.2	Zellkultur	36
3.2.1	Humane Glioblastom-Zelllinie HTZ-349.....	37
3.2.2	^{15}N -Markierung der Glioblastom-Zelllinie HTZ-349	37
3.2.3	Humane neurale Stammzelllinie ReNCX.....	38
3.2.4	Bestimmung der Zellvitalität	39
3.3	Einbettung der Zellen in einen Faden aus Agarosegel.....	39
3.4	Sterilität	41
3.4.1	Sterilisation des Perfusions-Systems	41
3.4.2	Sterilität der Probe	42
3.5	System- und Probenvorbereitung für eine Perfusionsmessung.....	43
3.6	Kontinuierliche pH-Messung	44
3.7	Kontinuierliche Sauerstoffmessung.....	45
3.7.1	Sensormolekül Hexamethyldisiloxan (HMDSO).....	45

3.7.2	Optische Sauerstoffsensoren.....	48
3.8	NMR-spektroskopische Messungen	50
3.8.1	Perfusionsmessungen.....	50
3.8.2	Kontinuierliche pH-Messung	51
3.8.3	Kontinuierliche Sauerstoffmessung mit Hexamethyldisiloxan (HMDSO).....	52
3.8.4	Mobile Proteine	52
4	Ergebnisse.....	53
4.1	Konstruktion des Perfusions-Systems.....	53
4.1.1	Technische Vorbereitungen.....	53
4.1.2	Kontinuierliche Überwachung des pH-Wertes mittels Histidin-Resonanzen	58
4.1.3	Kontinuierliche Überwachung des Sauerstoffgehaltes	61
4.1.3.1	Sauerstoffmessung mittels Sensormolekül HMDSO	61
4.1.3.2	Sauerstoffmessung mittels optischer Sensoren.....	66
4.1.4	Funktionstest des Injektors und der Injektionseinheit.....	68
4.2	^1H -NMR-sichtbare Metaboliten der untersuchten Zelllinien.....	70
4.3	Metabolische Untersuchungen der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349	75
4.3.1	HTZ-349 ohne Perfusion	76
4.3.2	HTZ-349 unter Perfusion bei normoxischen Bedingungen.....	82
4.3.3	HTZ-349 unter Perfusion bei hypoxischen Bedingungen	89
4.3.4	HTZ-349 unter Perfusion bei Variation des pH-Wertes.....	98
4.4	Metabolische Untersuchungen der humanen neuronalen Stammzelllinie ReNCX	106
4.4.1	Anpassung des Perfusions-Systems an die neurale Stammzelllinie	106
4.4.2	ReNCX unter Perfusion bei normoxischen Bedingungen	107
4.4.3	Mit Antisense Oligonukleotid behandelte ReNCX unter Perfusion bei normoxischen Bedingungen	115
4.5	Analyse des Glukose- und Glutamin-Metabolismus.....	122
4.6	Analyse des Sauerstoffverbrauchs und Korrelation mit der Zellvitalität.....	126
4.7	Analyse und Charakterisierung der mobilen Proteine der Zelllinie HTZ-349 mittels ^{15}N -Markierung	128
5	Diskussion	133
5.1	Vergleich des etablierten Perfusions-Systems mit vergleichbaren Systemen und Optimierungsmöglichkeiten	133
5.2	Interpretation und Vergleich der metabolischen Analyse der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349.....	135
5.2.1	HTZ-349 ohne Perfusion	136
5.2.2	HTZ-349 unter Perfusion bei normoxischen Bedingungen.....	138
5.2.3	HTZ-349 unter Perfusion bei hypoxischen Bedingungen	141

5.2.4	HTZ-349 unter Perfusion bei Variation des pH-Wertes	144
5.3	Interpretation und Vergleich der metabolischen Analyse der unbehandelten und mit Antisense Oligonukleotid behandelten humanen neuronalen Stammzelllinie ReNCX	147
5.4	Vergleich der metabolischen Analyse der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 mit der humanen neuronalen Stammzelllinie ReNCX	151
5.5	Charakterisierung der mobilen Proteine der Zelllinie HTZ-349 durch ¹⁵ N-Markierung	158
6	Zusammenfassung	160
7	Literatur	164
8	Danksagung	172

1 Einleitung

Die Metabolomik bezeichnet die Untersuchung biochemischer Prozesse und Wechselwirkungen aller Metaboliten eines Organismus. Aktuelle Forschungen auf diesem Gebiet lassen sich in zwei Gruppen einteilen: (1) Das Verstehen biologischer Prozesse und Zusammenhänge sowie (2) die Entwicklung von spezifischen Biomarkern [Xia et al. 2013]. Die Forschung im Bereich der Metabolomik kann daher helfen Erkrankungen, wie Tumorwachstum und Neurodegeneration, sowohl besser zu verstehen als auch frühzeitig zu erkennen. Zudem kann durch die Entwicklung von Biomarkern für zum Beispiel Tumorstammzellen, welche für die Bildung von Rezidiven und Metastasen verantwortlich gemacht werden, die Behandlungsstrategie angepasst und verbessert werden [Visvader & Lindeman 2008].

Zur metabolischen Untersuchung werden in der Metabolomik sowohl Körperflüssigkeiten wie Blutserum, Urin oder Liquor cerebrospinalis als auch Gewebeproben oder Zellen verwendet. Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMRS, *engl.* nuclear magnetic resonance spectroscopy) ist im Bereich der Metabolomik von lebendem Gewebe und intakten Zellen die wichtigste Analysemethode, da deren nicht-invasive Untersuchung des Stoffwechsels sie von anderen Methoden, wie zum Beispiel der Massenspektroskopie, unterscheidet. Zudem zeichnet sich die NMR-Spektroskopie durch eine hohe analytische Reproduzierbarkeit und einer einfachen Probenvorbereitung aus. Die NMR-Spektroskopie findet sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Anwendung, wobei die Untersuchung von lebendem Gewebe *in vitro* eine besondere Herausforderung darstellt, da die Zellen für eine Untersuchung über einen längeren Zeitraum unabdingbar eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, sowie einen konstanten physiologischen pH-Wert benötigen. Prinzipiell gibt es verschiedene Möglichkeiten, den Metabolismus von intakten Zellen und Gewebe mit der NMR-Spektroskopie zu untersuchen. Die einfachste Methode ist eine Untersuchung der Zellen in einer Suspension mit Nährmedium, jedoch wird die Zellvitalität dabei schnell durch den Stoffwechsel der Zellen und der damit einhergehenden Veränderungen der Umgebungsbedingungen, wie pH-Wert und Sauerstoffgehalt, beeinflusst, so dass nur kurzzeitige Messungen möglich sind. Um das zu untersuchende Gewebe länger vital zu halten, beziehungsweise die Bedingungen mehr in Richtung *in vivo* zu verschieben, wurden als weitere Möglichkeit spezielle Perfusionskammern konstruiert, welche die metabolische Analyse von intakten Organen bei kontinuierlicher Versorgung mit einem Medium gewährleisten [Burt et al. 1979]. So konnten unter anderem intakte Herzen von Ratten und Muskulatur von Fröschen unter Perfusion mit Hilfe der NMR-Spektroskopie metabolisch

untersucht werden [Garlick et al. 1977; Dawson et al. 1977]. Hierbei war die Größe der Perfusionskammer der limitierende Faktor, so dass alsbald versucht wurde, lebende Zellen mit der NMR-Spektroskopie metabolisch zu untersuchen, um eine Analysemethode für eine Vielfalt von verschiedenen Zelltypen zu etablieren.

Die größte Herausforderung bei vitalen Zellen unter Perfusion ist deren Immobilisierung in der Perfusionskammer. Die bisher angewandten Methoden reichen dabei von der direkten Kultivierung adhärenter Zellen auf der Oberfläche von Hohlfasern [Gonzalez-Mendez et al. 1982], über die Kultivierung von Zellen auf kollagenbeschichteten Polymerkügelchen [Mancuso et al. 2004; Shestov et al. 2016], bis hin zur Einbettung in Gel-Fäden oder Kügelchen [Lundberg et al. 1994; Jen et al. 1995; Kang et al. 2014]. Häufig wurde die Einbettung der Zellen in dünnen Fäden aus Agarosegel verwendet, da diese Methode mit relativ geringem Aufwand durchgeführt werden konnte, eine zuverlässige Immobilisation der Zellen bei gleichzeitiger Nährstoff- und Sauerstoffversorgung durch Diffusion erreicht, sowie eine ausreichende Permeabilität für metabolische Produkte gewährleistet wurde [Jacobson & Cohen 1981; Foxall & Cohen 1983; Foxall et al. 1984; Lyon et al. 1986; Daly et al. 1987; Lundberg et al. 1994]. Eine Einbettung in Alginat-Kügelchen oder eine Ummantelung des Agarosegels mit Alginatgel war dagegen bei Zellen mit kleinerem Durchmesser von Vorteil, wie zum Beispiel bei Erythrozyten, da sich das Alginatgel durch eine geringere Porengröße auszeichnet [Lundberg et al. 1992; Lundberg et al. 1994]. Allgemein ist bei einer Einbettung von Zellen wichtig, dass die Dicke des Gelfadens oder der Durchmesser der Gelkügelchen so gering wie möglich gehalten werden, damit der Transport der Nährstoffe und des Sauerstoffs durch Diffusion noch ausreichend ist und sich keine Nekrose im Kern ausbildet [Jen et al. 1995].

Weitere Herausforderungen bei der Etablierung von Perfusions-Systemen waren vor allem bei Langzeitmessungen die Sterilität des Perfusionssystems und die Kontrolle der Rahmenbedingungen wie Temperatur, Sauerstoffgehalt und pH-Wert in der Perfusionskammer. Zur Vermeidung eines Wachstums von Mikroorganismen im System wurden daher meist Antibiotika und Antimykotika in das Perfusionsmedium zugegeben, sowie die Bestandteile des Perfusions-Systems durch Verwendung von 70%igem Ethanol desinfiziert, oder so weit möglich mittels Autoklavieren sterilisiert [Gonzalez-Mendez et al. 1982; Ng et al. 1992]. Die Kontrolle der Parameter konnte durch Sensoren in den Zu- und Ableitungen zur Perfusionskammer realisiert werden [Lyon et al. 1986; Mancuso et al. 2004]. Zur Überwachung des pH-Wertes wurde außerdem die Messung über die Änderung der chemischen Verschiebung einer Indikatorresonanz mittels ^{31}P NMR angewendet [Gonzalez-Mendez et al. 1982; Lundberg et al. 1992; Ng et al. 1992]. Der Sauerstoffgehalt konnte ebenfalls über die chemische Verschiebung mittels ^{19}F NMR kontrolliert werden [Gross et al. 2007]. Diese Methoden ermöglichten somit eine direkte Messung der Parameter in der Perfusionskammer.

Nur bei wenigen bisher etablierten Perfusions-Systemen wurden dabei sowohl pH-Wert als auch Sauerstoffgehalt überwacht [Lyon et al. 1986; Ng et al. 1992; Mancuso et al. 2004], dabei konnte meist nur der pH-Wert über Titrationen oder einer Variation der CO_2 -Begasung eingestellt werden. Der Sauerstoffgehalt wurde meist nicht verändert, oder nur grob über die Begasung mit Sauerstoff oder Stickstoff geregelt [Gross et al. 2007], aber auf Grund der Permeabilität der Leitungssysteme konnte mit diesem Aufbau keine Hypoxie in der

Perfusionskammer erreicht werden. Der Fokus der metabolischen Analysen lag bei den bisher durchgeführten Perfusionsexperimenten zudem hauptsächlich auf dem Energiestoffwechsel, also der Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) und dem Glukose Metabolismus, weswegen größtenteils ^{31}P -NMR und, in Kombination mit ^{13}C -markierter Glukose, ^{13}C -NMR angewendet wurden. Für ein gutes Signal zu Rausch Verhältnis musste daher, vor allem bei der Verwendung der Phosphorkerne, auf Grund der geringeren natürlichen Häufigkeit eine längere Aufnahmezeit in Kauf genommen werden. Oft waren die Perfusions-Systeme zudem auf Grund großer Volumina der Perfusionskammern und hoher Perfusionsraten (bis zu 16 ml/min [Gonzalez-Mendez et al. 1982]) als Kreisläufe konstruiert, wodurch sich metabolische Abfallprodukte der Zellen im Perfusionsmedium ansammelten.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein Perfusions-System an einem hochauflösenden 800 MHz-Spektrometer mit Cryo-Probenkopf zu konstruieren, um unter definierten Bedingungen den Metabolismus vitaler humaner Glioblastom-Zellen und neuraler Stammzellen mittels ^1H -NMR zu untersuchen. Neben der höchsten natürlichen Häufigkeit liefert die Verwendung der Protonenspektroskopie zudem die Möglichkeit der direkten Translation der Ergebnisse in die klinische Routine. Die Anforderungen an das Perfusions-System waren variierbare und permanent kontrollierbare Parameter wie Flussrate, Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffgehalt im Medium. Zudem sollte das System gasdicht sein, um hypoxische Bedingungen in der Perfusionskammer zu realisieren und über ein Injektionssystem sollten Additive direkt in die Perfusionskammer zugegeben werden können. Durch die Realisierung eines solchen Aufbaus und der Etablierung eines sterilen Systems sowie einer sterilen Probenvorbereitung können Zellen unter variablen und kontrollierten Bedingungen über mehrere Tage analysiert und metabolische Veränderungen detektiert werden.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel soll die theoretische Grundlage geschaffen werden um die Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit nachvollziehen zu können. Dazu wird sowohl auf die Relaxation der Magnetisierung als auch auf T_2 - und diffusions-gewichtete Spektren eingegangen. Zudem wird die mathematische Umformung der Henderson-Hasselbalch Gleichung dargelegt, mit deren Hilfe der pH-Wert in der Perfusionskammer bestimmt werden konnte. Als weiterer Punkt wird auf den Zellmetabolismus von Tumor- und Stamm- beziehungsweise Progenitorzellen sowie auf die NMR-sichtbaren makromolekularen Resonanzen eingegangen. Außerdem wird die Behandlung der neurodegenerativen Erkrankung ALS mit Hilfe eines Antisense Oligonukleotids erörtert.

2.1 Relaxation und T_2 -gewichtete Spektren

Nach Auslenkung der Magnetisierung aus der thermischen Gleichgewichtslage, durch das Einstrahlen mit einem hochfrequenten Puls, kehrt sie über sogenannte Relaxationsprozesse wieder in ihre Ausgangslage zurück. Dies wird durch die Bloch'schen Bewegungsgleichungen beschrieben:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma[\mathbf{M} \times \mathbf{B}]_x - \frac{M_x}{T_2} \quad (2.1)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma[\mathbf{M} \times \mathbf{B}]_y - \frac{M_y}{T_2} \quad (2.2)$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma[\mathbf{M} \times \mathbf{B}]_z - \frac{M_z - M_0}{T_1} \quad (2.3)$$

Dabei ist γ das kernspezifische gyromagnetische Verhältnis, \mathbf{B} ist der magnetische Feldvektor, \mathbf{M} steht für den Vektor der Magnetisierung mit den entsprechenden Anteilen M_x , M_y und M_z , T_1 beschreibt die longitudinale und T_2 die transversale Relaxationszeit [Cavanagh et al. 2007].

Die longitudinale Relaxation ist eine Wechselwirkung von Spins mit dem Gitter und die Rückkehr der Spins zur Boltzmann-Verteilung ihrer Zustände. Durch die sogenannte „Inversion-Recovery“ Methode, bei der zu Beginn eine Auslenkung der Magnetisierung um 180° erfolgt, kann die longitudinale Relaxationszeit T_1 bestimmt werden. Dazu folgt dem 180° -Puls nach variierender Zeit τ ein 90° -Puls, wodurch die Magnetisierung in die Detektionsebene gerichtet wird. Je nach Fortschritt der Relaxation während der Zeit τ folgt daraus somit ein bestimmtes $M_z(\tau)$. Aus Gleichung 2.3 ergibt sich nach dem angelegten Puls mit den Anfangsbedingungen $M_x(0) = M_y(0) = 0$ und $M_z = -M_0$ die Zeitabhängigkeit der Magnetisierung zu

$$M_z(\tau) = M_0 \left[1 - 2 \cdot \exp\left(\frac{-\tau}{T_1}\right) \right] \quad (2.4)$$

Aus diesem Zusammenhang kann die Spin-Gitter Relaxation für variierende Zeiten τ ermittelt werden [Levitt 2008].

Zur Optimierung der Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit T_1 kann zusätzlich der Auslenkwinkel α in der Gleichung 2.4 berücksichtigt werden:

$$M_z(\tau) = M_0 \left[1 - (1 - \cos\alpha) \cdot \exp\left(\frac{-\tau}{T_1}\right) \right] \quad (2.5)$$

Die Bestimmung der Spin-Gitter Relaxationszeit T_1 kann dann durch die Intensitäten der Magnetisierung $M_z(\tau)$ bei variierender Zeit τ bestimmt werden [De Graaf 2007]. Durch einen Fit des Verlaufs der Magnetisierung mit Gleichung 2.5 kann die longitudinale Relaxationszeit T_1 zusammen mit dem Auslenkwinkel α als Fitparameter ermittelt werden.

Die transversale Relaxation resultiert aus Spin-Spin Wechselwirkungen und dem Verlust der Phasenkohärenz. Diese T_2 -Relaxationszeit lässt sich durch die klassische Spin-Echo-Pulssequenz nach Erwin Hahn nachweisen. Bei dieser Methode wird die Magnetisierung zu Beginn um 90° ausgelenkt. Auf Grund der Spin-Spin Relaxation laufen die Spins mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten auseinander, sie dephasieren. Nach einer Dauer $\tau/2$ folgt dann ein 180° -Puls, welcher die Spins nach einer weiteren Zeit $\tau/2$ wieder rephasieren lässt. Diese Fokussierung der Spins nach einer gesamten Dauer τ verursacht also ein detektierbares Echo. Mit den Anfangsbedingungen $M_x(0) = M_z(0) = 0$ und $M_y(0) = M_0$

beziehungsweise $M_y(0) = M_z(0)$ und $M_x(0) = M_0$ ergibt sich aus den Gleichungen 2.1 und 2.2 somit die zeitliche Abhängigkeit der Magnetisierung $M_{x,y}$ zu

$$M_{x,y}(\tau) = M_0 \cdot \exp\left(\frac{-\tau}{T_2}\right) \quad (2.6)$$

Die transversale Magnetisierung verliert also auf Grund der Spin-Spin Relaxation T_2 mit zunehmenden Pulsabstand τ exponentiell an Intensität [Levitt 2008].

Bei der Spin-Echo-Methode besteht allerdings der Nachteil, dass die T_2 -Relaxation durch Diffusion beeinflusst wird. Die Carr-Purcell-Meiboom-Gill Methode (CPMG) reduziert diese Beeinträchtigung durch eine Reihe von 180° -Pulsen. Nach dem anfänglichem 90° -Puls und dem im Abstand τ folgendem ersten 180° -Puls werden bei dieser Methode in einem jeweiligen zeitlichen Abstand von 2τ weitere 180° -Pulse angewendet. Da sich durch diese Abfolge an 180° -Pulsen Abweichungen vom Auslenkwinkel aufsummieren könnten, ist bei der CPMG-Methode der 90° -Puls im Vergleich zu den 180° -Pulsen um 90° phasenverschoben. Dadurch wird ein potenzieller Fehler bei jedem zweiten Echo korrigiert. Die Einhüllende der mit dieser Methode gewonnen Echos wird durch Gleichung 2.6 beschrieben [Carr & Purcell 1954; Meiboom & Gill 1958].

Zwischen der Halbwertsbreite der Resonanzen $\Delta\nu_{1/2}$ im Spektrum und der transversalen Relaxation T_2 gilt folgender Zusammenhang [Levitt 2008]:

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2} \quad (2.7)$$

Im Allgemeinen besitzen in der Beweglichkeit eingeschränkte intrazelluläre Metaboliten eine deutlich kürzere Spin-Spin Relaxationszeit T_2 als frei bewegliche extrazelluläre Metaboliten. Dadurch erscheinen intrazelluläre Resonanzen im Spektrum nach Gleichung 2.7 verbreitert, während extrazelluläre Metaboliten scharfe Resonanzen ergeben.

Der Grund dafür liegt in der inversen Proportionalität der transversalen Relaxation T_2 zur rotatorischen Korrelationszeit τ_c [De Graaf 2007]:

$$\frac{1}{T_2} \propto \tau_c \quad (2.8)$$

Die rotatorische Korrelationszeit τ_c beschreibt die Zeit, welche ein Molekül benötigt sich um 1 rad zu drehen. In der Beweglichkeit eingeschränkte Moleküle zeigen dementsprechend eine längere Korrelationszeit τ_c und damit kürzere transversale Relaxationszeiten T_2 .

Durch die Verwendung eines T_2 -gewichteten Pulsprogramms werden also Resonanzen von extrazellulären Metaboliten im Spektrum hervorgehoben, da die intrazellulären Resonanzen eine stärkere Abschwächung der Intensität erfahren.

2.2 Diffusions-gewichtete Spektren und Diffusionskoeffizient

Zur Hervorhebung von intrazellulären Metaboliten kann ein diffusions-gewichtetes Pulsprogramm verwendet werden. Hauptsächlich besteht ein solches Programm aus zwei magnetischen Gradienten entlang der z-Achse, also in Perfusionsrichtung, welche einem anfänglichem 90°-Puls folgen. Die Zeit zwischen den beiden Gradienten wird als Diffusionszeit bezeichnet. Durch den ersten Gradienten dephasieren die Spins und wenn keine Diffusion in der Zeit zwischen den Gradienten stattfindet werden die Spins nahezu vollständig rephasiert, sie zeigen dann volle Signalstärke im Spektrum. Wenn jedoch eine Bewegung in z-Richtung erfolgt erfahren die Spins beim zweiten Gradienten auf Grund der Ortsänderung ein anderes Magnetfeld, wodurch die Rephasierung der Spins beeinträchtigt wird. Somit wird die Intensität von diffundierenden Metaboliten abgeschwächt. Dieser Effekt wird in der Perfusionskammer durch den Fluss des Mediums in z-Richtung zusätzlich verstärkt. Somit ist es möglich durch die Verwendung entsprechender Gradientenstärken die Intensität der extrazellulären Metaboliten stark abzuschwächen und damit die intrazellulären Resonanzen im Spektrum hervorzuheben [Levitt 2008].

Im Falle des hier verwendeten Pulsprogramms „diffu-oneshot“ handelt es sich bei den Gradienten um asymmetrische bipolare Gradienten, welche jeweils um einen 180°-Puls angeordnet sind. Zudem wird die Magnetisierung während der Diffusionszeit in die z-Richtung ausgelenkt und weitere angelegte Gradienten während der Diffusionszeit heben das, aus der Asymmetrie entstandene, Ungleichgewicht der Gradienten auf [Pelta et al. 2002].

Die Intensitätsabschwächung durch ein diffusions-gewichtetes Spektrum wird allgemein durch folgenden Zusammenhang beschrieben:

$$I = I_0 \cdot \exp(-b \cdot D) \quad (2.9)$$

Dabei steht I für die Intensität der Resonanz, I_0 ist die maximale Intensität ohne Abschwächung und D der Diffusionskoeffizient, welcher ein Maß für die Bewegung von Molekülen auf Grund

von Diffusion ist. Der sogenannte b -Wert ist dabei abhängig von der Art des Pulsprogrammes. Bei dem verwendeten „diffu-oneshot“ setzt er sich bei gleicher Anordnung der asymmetrischen Gradientenpaare wie folgt zusammen:

$$b = \gamma^2 g^2 \delta^2 \left[\Delta + \frac{\delta(\alpha^2 - 2)}{6} + \frac{\tau(\alpha^2 - 1)}{2} \right] \quad (2.10)$$

Der Koeffizient γ beschreibt dabei das kernspezifische gyromagnetische Verhältnis, g steht für die Gradientenstärke, δ ist die gesamte Dauer des angelegten bipolaren Gradienten, Δ ist die Diffusionszeit zwischen den Gradientenpaaren, α ist der Asymmetrie-Faktor und τ beschreibt den zeitlichen Abstand zwischen den bipolaren Gradienten [Pelta et al. 2002].

2.3 pH-Bestimmung durch Henderson-Hasselbalch Gleichung

Zur Bestimmung des pH-Wertes über die chemische Verschiebung eines Indikators mittels der Kernspinresonanzspektroskopie wird als Ausgangspunkt die Henderson-Hasselbalch Gleichung verwendet:

$$pH = pK_s + \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right) \quad (2.11)$$

Die Variable pK_s steht dabei für den negativen dekadischen Logarithmus der Säurekonstanten, HA steht für die Säure und A^- für die Base in wässriger Lösung. Um diese Gleichung durch die chemische Verschiebung eines Standards und eines Indikators auszudrücken sind nach Ackerman et al. [Ackerman et al. 1996] einige Definitionen und Rechenschritte notwendig.

Im thermodynamischen Gleichgewicht gilt für eine Säure/Base-Reaktion:

$$K_s^{ref} = \frac{[H^+]}{X_s^{ref}} \cdot X_b^{ref} \quad (2.12)$$

und

$$K_s^{ind} = \frac{[H^+]}{X_s^{ind}} \cdot X_b^{ind} \quad (2.13)$$

K_s^{ref} ist hierbei die Variable für die Säurekonstante der Referenz, während K_s^{ind} die Säurekonstante des Indikators ist. X_s^{ref} und X_s^{ind} stehen für den jeweiligen Stoffmengenanteil der sauren Form und X_b^{ref} sowie X_b^{ind} sind der jeweilige Stoffmengenanteil der basischen Form.

Mit $X_s + X_b = 1$ folgt nach Umformungen aus den [Gleichungen 2.12](#) und [2.13](#)

$$X_s^{ref} = \frac{[H^+]}{K_s^{ref} + [H^+]} \quad (2.14)$$

und

$$X_s^{ind} = \frac{[H^+]}{K_s^{ind} + [H^+]} \quad (2.15)$$

Die gemittelten chemischen Verschiebungen des Austausches werden wie folgt definiert:

$$\bar{\delta}^{ref} = X_s^{ref} \cdot \delta_s^{ref} + X_b^{ref} \cdot \delta_b^{ref} \quad (2.16)$$

und

$$\bar{\delta}^{ind} = X_s^{ind} \cdot \delta_s^{ind} + X_b^{ind} \cdot \delta_b^{ind} \quad (2.17)$$

Dabei sind δ_s^{ref} und δ_s^{ind} die jeweiligen chemischen Verschiebungen der sauren Form und δ_b^{ref} und δ_b^{ind} die jeweiligen chemischen Verschiebungen der basischen Form. Die basische Form der chemischen Verschiebung der Referenz wird nach Definition auf einen Wert von $\delta_b^{ref} = 0$ ppm gesetzt.

Mit der Definition für die betrachteten chemische Verschiebung δ_{obs}

$$\delta_{obs} = \bar{\delta}^{ind} - \bar{\delta}^{ref} \quad (2.18)$$

und den [Gleichungen 2.14](#), [2.15](#), [2.16](#) und [2.17](#) ergibt sich somit für δ_{obs} :

$$\delta_{obs} = \frac{[H^+]}{K_s^{ind} + [H^+]} \cdot (\delta_s^{ind} - \delta_b^{ind}) + \delta_b^{ind} - \frac{[H^+]}{K_s^{ref} + [H^+]} \cdot \delta_s^{ref} \quad (2.19)$$

Für den Fall $[H^+] \ll K_s^{ref}$ sowie $\delta_s^{ind} = \delta_{HA}$ (chemische Verschiebung der protonierten Form) und $\delta_b^{ind} = \delta_{A^-}$ (chemische Verschiebung der deprotonierten Form) folgt schließlich:

$$\delta_{obs} = \frac{[H^+] \delta_{HA} + K_s^{ind} \delta_{A^-}}{K_s^{ind} + [H^+]} \quad (2.20)$$

Daraus lässt sich mit den Zusammenhängen $pH = -\log [H^+]$ und $pK_s = -\log K_s$ dann letztlich schreiben:

$$pH = pK_s + \log \left(\frac{\delta_{HA} - \delta_{obs}}{\delta_{obs} - \delta_{A^-}} \right) \quad (2.21)$$

Mit dieser Gleichung ist es dann durch die Bestimmung der chemischen Verschiebung einer Indikator-Resonanz (δ_{obs}) möglich den pH-Wert in der Probe zu bestimmen [Ackerman et al. 1996; Popov et al. 2006; Rabenstein & Isab 1982].

2.4 Zellmetabolismus

In diesem Kapitel werden die Grundlagen des Metabolismus von Tumor- und Stammzellen beschrieben. Außerdem wird auf die Eigenschaften von Stammzellen eingegangen und ein Überblick über die NMR-sichtbaren mobilen Lipide und Proteine gegeben, welche im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls analysiert wurden.

2.4.1 Glioblastome und Tumorzellmetabolismus

In dieser Arbeit wurden humane Gehirn-Tumorzellen (WHO Grad IV), sogenannte Glioblastom-Zellen, metabolisch untersucht. Glioblastome sind die am stärksten malignen und häufigsten adulten Gehirntumore. Trotz erheblicher Fortschritte in der Diagnose und Therapie mittels mikro-neurochirurgischer Resektion, sowie Strahlen- und Chemotherapie, liegt die mittlere Überlebenszeit der Patienten bei nur 1 - 2 Jahren. Glioblastome zeigen einen sehr heterogenen Aufbau, sie beinhalten verschiedene Zelltypen, zu denen auch Gliazellen und Neuronen gehören, wodurch eine Behandlung zusätzlich erschwert wird. Zudem enthält das Tumorgewebe auch Tumorstammzellen, welche einen der Hauptgründe für die Resistenz

gegenüber der Therapie darstellen [Kahlert et al. 2017]. Metabolische Untersuchungen von Tumorzellen können daher zum Beispiel durch die Etablierung von Biomarkern für die Tumorstammzellen dazu beitragen, die Behandlung von Tumoren zu verbessern oder neue Behandlungsstrategien zu entwickeln.

Einer der bedeutendsten Metaboliten im Zellmetabolismus ist Glukose. Im Zytoplasma der Zellen wird ein Molekül Glukose durch die Glykolyse zu zwei Molekülen Pyruvat umgewandelt, welche dann in den Citratzyklus eingebunden werden können. Der Citratzyklus wird auf Grund der Kopplung mit der Atmungskette bei aeroben Bedingungen durchlaufen. Bei anaeroben Bedingungen wird ein Molekül Glukose durch Glykolyse letztlich zu zwei Molekülen Laktat umgewandelt. Die Besonderheit des Tumorzellmetabolismus ist die hauptsächliche Metabolisierung der Glukose zu Laktat – trotz aerober Bedingungen – was als Warburg-Effekt bezeichnet wird [Warburg et al. 1924].

In einer proliferativen Phase wird der Citratzyklus auch bei Tumorzellen zu einem kleinen Anteil durchlaufen, um die benötigten Ausgangsstoffe wie Aminosäuren, Proteine, Lipide und Nukleotide zu bilden, die für eine Zellteilung notwendig sind. Diese Prozesse, welche die Synthese von Nukleotiden, Proteinen und Lipide in der Zelle vorantreiben werden unter dem Begriff Anabolismus zusammengefasst. Der Anabolismus ist in einer proliferierenden Zelle der bevorzugte Prozess. In einem quieszenten Zustand der Zelle, also einem ruhenden Status, wird dagegen die Biosynthese stark reduziert, wodurch Anabolismus und Katabolismus, welcher den Abbau von Metaboliten zugunsten der Energiegewinnung beschreibt, im Gleichgewicht stehen. Dementsprechend werden Proteine und Lipide in einer quieszenten Zelle sowohl synthetisiert als auch abgebaut [Mayers & Vander Heiden 2015].

In Tumorzellen wird die Glukose hauptsächlich zu Laktat umgewandelt, wobei zwei Moleküle ATP pro umgesetzten Molekül Glukose durch die Glykolyse frei werden. Dies ist deutlich weniger Energieausbeute, als die 38 Moleküle ATP, die durch zusätzliches Nutzen des Citratzyklus und der Atmungskette (oxidative Phosphorylierung) insgesamt produziert werden können [Gatenby & Gillies 2004]. Auf Grund der hohen Glykolyserate bei Tumorzellen, welche das bis zu 200-fache von gesunden Zellen betragen kann, ist der Energiebedarf der Tumorzellen trotzdem gedeckt [Alfarouk 2016]. Zudem werden dadurch glykolytische Metaboliten schneller bereitgestellt, wodurch der Anabolismus beschleunigt wird [Lunt & Vander Heiden 2011].

Nach der Glukose ist Glutamin der nächst häufigste konsumierte Metabolit von Zellen in Kultur [Mayers & Vander Heiden 2015]. Während Glukose im Citratzyklus durch Umwandlung von Pyruvat zu Citrat hauptsächlich zur Lipidsynthese beiträgt, hält Glutamin durch Umwandlung zu Glutamat und weiter zu α -Ketoglutarat den Citratzyklus weiter aufrecht ([Abbildung 2.1](#)). Zudem spielt Glutamin eine Rolle bei der Nukleotid- und Protein-Synthese. Glutamin kann außerdem als Energiequelle von Tumorzellen genutzt werden, indem es über den Citratzyklus zu Malat und schließlich zu Laktat umgewandelt wird. Dies ist auch bekannt unter dem Begriff Glutaminolyse [DeBerardinis et al. 2008].

Die Aminosäure Glutamin kann sowohl durch enzymatische Prozesse als auch durch einen spontanen Vorgang, ohne Beteiligung der Zellen, unter Abspaltung von Ammoniak (NH_3) auch zu Pyro-Glutamat umgewandelt werden. Pyro-Glutamat an sich ist ein noch wenig erforschter

Metabolit. Seine Rolle im Zellmetabolismus ist daher noch nicht vollständig geklärt. Pyro-Glutamat könnte als Speicherform von Glutamat dienen, oder als osmoprotektive Substanz fungieren [Kumar & Bachhawat 2012].

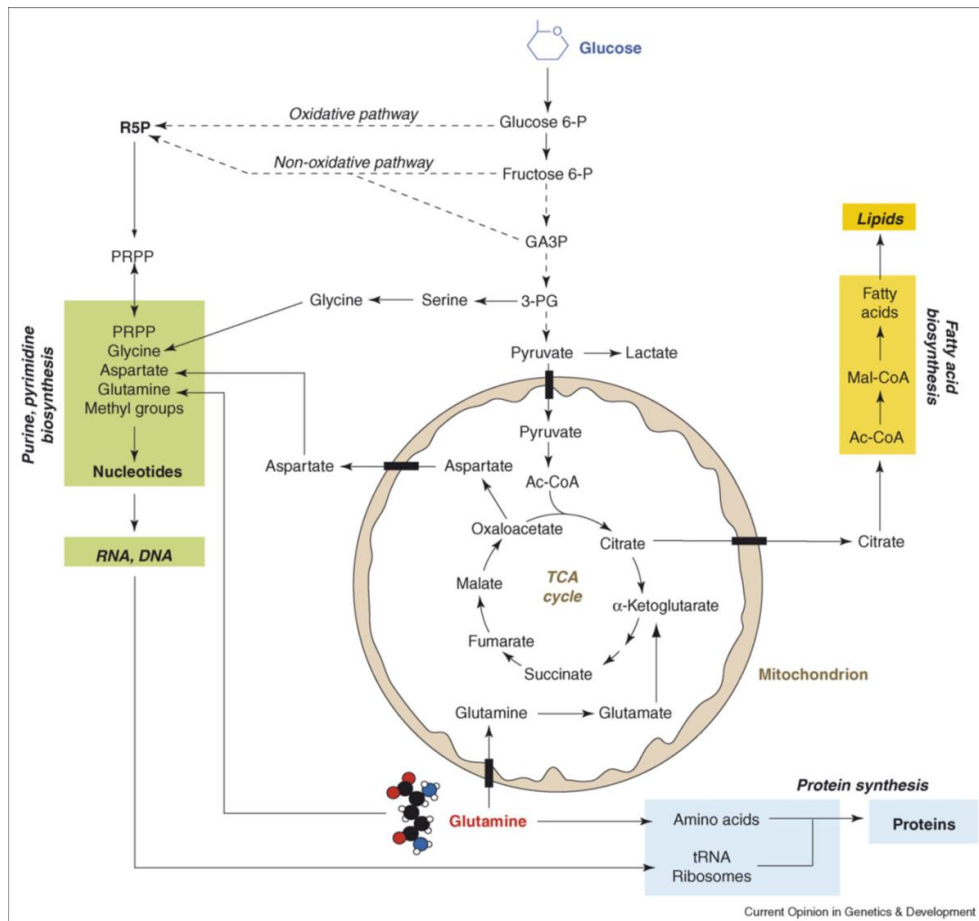


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des Tumorzellmetabolismus. Dargestellt sind die beiden durch Tumorzellen am stärksten konsumierten Metaboliten Glukose und Glutamin. Zudem werden ihre Beiträge über den Citratzyklus zur Lipid-, Protein- und Nukleotid-Synthese dargestellt, welche für proliferierende Zellen notwendig sind. Nur durch die gleichzeitige Aufnahme und Umwandlung von Glukose und Glutamin ist es möglich, den Citratzyklus aufrecht zu erhalten, während in proliferierenden Zellen die Lipidsynthese über Citrat stattfindet. Entnommen aus [DeBerardinis et al. 2008].

Andere Aminosäuren wie Serin, Glycin und Aspartat werden ebenfalls zur Bildung von Nukleotiden benötigt, welche die Grundbausteine der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und der Ribonukleinsäure (RNS) darstellen [DeBerardinis et al. 2008]. Valin, Leucin und Isoleucin können als Kohlenstoffquellen für den Citratzyklus dienen [Mayers & Vander Heiden 2015]. Ansonsten werden Aminosäuren hauptsächlich für die Proteinsynthese benötigt. Ein Bedarf an Aminosäuren besteht also hauptsächlich in der proliferativen Phase einer Zelle.

Eng mit dem Lipidmetabolismus ist der Cholin-Metabolismus verbunden. Cholin kann durch entsprechende Transporter von den Zellen aufgenommen werden und über Phosphocholin zu Phosphatidylcholin umgewandelt werden, welche einen essentiellen Bestandteil der Lipiddoppelschicht der Zellmembran darstellen. In Tumorzellen ist der gesamte Anteil an Cholin enthaltenden Substanzen auf Grund der verstärkten Proliferation stark erhöht [Glude

et al. 2011]. Diese Erhöhung lässt sich dabei hauptsächlich auf eine Zunahme der Phosphocholin-Konzentration zurückführen. Glycerophosphocholin, welches ein Abbauprodukt von Phosphatidylcholin ist, zeigt in Tumorzellen dagegen eine verminderte Konzentration im Vergleich zu gesunden Zellen [Podo 1999; Glunde et al. 2011]. Damit stellt der gesamte Anteil an Cholin enthaltenden Substanzen praktisch ein Maß für die metabolische Umsetzung der Zellmembranen dar.

2.4.2 Stammzellen und Stammzellmetabolismus

Stammzellen werden durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung charakterisiert. Neurale Stammzellen sind multipotente Stammzellen, welche in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten ausdifferenzieren können [Taupin & Gage 2002; Massirer et al. 2011]. In der Literatur wird häufig zwischen neuronalen Stammzellen und neuronalen Progenitorzellen (auch Vorläuferzellen genannt) unterschieden. Die neuronalen Progenitorzellen tendieren dabei mehr in Richtung Differenzierung als Stammzellen, sie können aber dennoch in dieselben Zelltypen ausdifferenzieren. Eine klare Unterscheidung durch Biomarker, wie zu Beispiel Nestin, welches ein Marker für beide Zellarten darstellt, ist allerdings bis heute nicht möglich [De Filippis & Binda 2012].

Neurale Stammzellen sind für die Neurogenese im adulten Gehirn verantwortlich, welche in zumindest zwei Bereichen des zentralen Nervensystems sicher nachgewiesen werden konnte, in der subventrikulären Zone der lateralen Ventrikel und der subgranulären Zone des Gyrus dentatus im Hippocampus. Die lokale Position, an der sich die Stammzellen befinden, wird auch Stammzell-Nische genannt und sie zeichnet sich durch Bedingungen aus, welche die Stammzellen in dem Zustand der Selbsterneuerung halten, dazu zählt unter anderem die Hypoxie [Shyh-Chang et al. 2013]. Die Nische selbst besteht aus der extrazellulären Matrix, Blutgefäßen, Neuronen und Gliazellen. Die extrazelluläre Matrix ist ein komplexes Netzwerk aus interagierenden Molekülen, welche in der Lage sind, das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und die Migration der Stammzellen zu beeinflussen [Massirer et al. 2011; Roll & Faissner 2014].

Die Neuronen des Gehirns stammen aus einer relativ kleinen Anzahl an neuronalen Stamm- und Progenitorzellen. Der Grund dafür ist, dass sich diese Zellen zunächst während der Entwicklung des Gehirns symmetrisch teilen, also in zwei Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften, um die Anzahl an Stammzellen zu erhöhen. Im adulten Gehirn jedoch schalten die Zellen dann auf eine asymmetrische Zellteilung um, welche eine Zelle mit Stammzeleigenschaft und eine differenzierte Zelle produziert. Stammzellen, welche ihr Soll an Zellteilungen erfüllt haben, werden dann möglicherweise apoptotisch, oder gehen in einen Ruhezustand über [Homem et al. 2015].

Proliferation und Selbsterneuerung der Stammzellen werden unter anderem durch Wachstumsfaktoren wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (*engl.* epidermal growth factor, EGF) und dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*engl.* fibroblast growth factor, FGF) gefördert.

Durch Zugabe dieser Wachstumsfaktoren in das Kulturmedium *in vitro* wird somit die ausschließliche Ausdifferenzierung der Stammzellen verhindert [Morrison et al. 1997; De Filippis & Binda 2012].

Die meisten adulten Stammzellen sind quieszent und zeigen daher einen von katabolischer Glykolyse geprägten Metabolismus. Zudem schützt der ruhende Zustand die Zellen vor Schäden wie zum Beispiel durch Sauerstoff-Radikale [Shyh-Chang et al. 2013]. Proliferierende Stammzellen zeigen dagegen einen stark anabolischen Metabolismus. Dies resultiert in einem erhöhten Bedarf an Lipiden sowie an Metaboliten wie Glukose und Glutamin ([Abbildung 2.2](#)). Der Glukose- und Glutamin-Metabolismus spielen bei Stammzellen, wie auch bei allen proliferierenden Tumor-Zellen, eine große Rolle, da beide Metaboliten zum Citratzyklus beitragen und Ausgangsstoffe für die Synthese von Lipiden, Nukleotiden und Aminosäuren darstellen [Oburoglu et al. 2014]. In proliferierenden neuralen Stammzellen konnte außerdem eine starke Lipidsynthese beobachtet werden, welche Lipide für die Zellmembran zur Verfügung stellen. Schwach proliferierende Stammzellen zeigten dementsprechend eine nur sehr geringe Lipidsynthese [Homem et al. 2015].

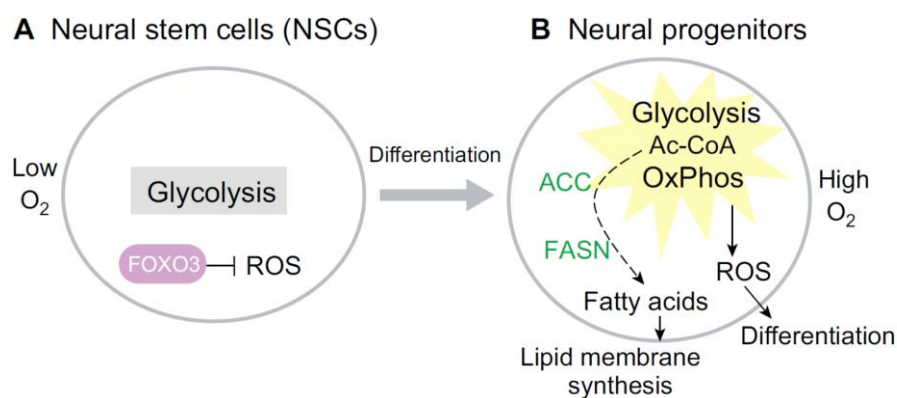


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung des Metabolismus von neuralen Stamm-/Progenitorzellen. A) In der Nische befinden sich neurale Stammzellen in einem quieszenten (ruhenden) Zustand. Bei niedrigem Sauerstoffgehalt (Hypoxie) findet nur in geringem Maße Glykolyse statt, zudem wird die Produktion von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) unterdrückt. B) Außerhalb der Nische, bei höherem Sauerstoffgehalt, werden die neuralen Stammzellen mehr in Richtung Differenzierung gedrängt. In diesen neuralen Progenitorzellen wird die Glykolyse hochreguliert und zudem oxidative Phosphorylierung (OxPhos) betrieben. Die erhöhte Konzentration an ROS bewegt die Zelle zur Differenzierung, wodurch unter anderem der Bedarf an Fettsäuren für die Synthese der Phospholipid-Membran entsteht. Dieser wird durch die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) und der Fettsäure-Synthase (FASN) gedeckt. Entnommen aus Shyh-Chang et al. [Shyh-Chang et al. 2013].

Auch bei Tumoren sind Tumorstammzellen, welche alle Eigenschaften von Stammzellen besitzen, für die Proliferation verantwortlich [Vescovi et al. 2006]. Chen et al. [Chen et al. 2012] konnten zeigen, dass der Ursprung von malignen Gliomen in der subventrikulären Zone lag und schlossen daraus, dass adulte neurale Stammzellen den Ausgangspunkt für solche Tumoren darstellen können. Zudem erschweren diese Tumorstammzellen eine Behandlung, da sie weniger sensitiv gegenüber Chemo- und Strahlentherapie sind wie das normale Tumorgewebe. Daher führen die Tumorstammzellen nach der Behandlung zur Entstehung von Reziden und sind auch für die Bildung von Metastasen verantwortlich [Maugeri-Saccà et al. 2013; Visvader & Lindeman 2008].

2.4.3 Makromolekulare Resonanzen im ^1H -NMR-Spektrum

Im ^1H -NMR-Spektrum von Zellen können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* breite Resonanzen beobachtet werden, welche von Lipiden und Proteinen stammen. Diese Makromoleküle werden als mobile Lipide und Proteine bezeichnet, da sie eine Beweglichkeit auf molekularer Ebene besitzen, beziehungsweise bewegliche Anteile enthalten, so dass sie mit der Methode der Kernspinresonanzspektroskopie detektierbar sind. In den folgenden Unterkapiteln werden sowohl der Ursprung dieser Signale, als auch die grundlegenden Theorien im Kontext der aktuellen Forschung dargestellt.

2.4.3.1 Mobile Lipide

Im Bereich zwischen 0,9 - 5,3 ppm sind im Protonenspektrum breite Resonanzen von NMR-sichtbaren mobilen Lipiden erkennbar ([Abbildung 2.3](#)), welche sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden konnten [Ferretti et al. 1999]. Im gesunden humanen Gehirn sind jedoch keine mobilen Lipidresonanzen zu beobachten. Unter Stressbedingungen wie Konfluenz, Verringerung des pH-Wertes, Apoptose, Nekrose und Behandlung mit zytotoxischen Substanzen sowie bei vielen Tumorzellen wurden dagegen mobile Lipidresonanzen gesichtet [Delikatny et al. 2011; Hakumäki & Kauppinen 2000; Ramm Sander et al. 2013]. Im Gehirn sind die meisten Lipide in den Lipiddoppelschicht-Zellmembranen enthalten, wodurch sich die NMR-Unsichtbarkeit dieser Lipide erklärt, da ihre Beweglichkeit in der Membran stark eingeschränkt ist [Delikatny et al. 2011].

Es existieren zwei Hypothesen, welche den lokalen Ursprung der mobilen Lipide beschreiben. Die Erste besagt, dass neutrale Lipide, welche hauptsächlich aus Triacylglycerolen (TAG) bestehen, in kleinen sich isotrop bewegendenden Mikrodomänen in der Plasmamembran, mit einem Durchmesser von 25 - 28 nm, die Quelle der Lipidresonanzen sind [Mountford & Wright 1988]. Die zweite Hypothese macht die Anhäufung von Lipid-Tröpfchen, mit einem mittleren Durchmesser von ca. 1 - 2 μm , im Zytoplasma intakter Zellen dafür verantwortlich [Callies et al. 1993]. Es könnte jedoch auch eine Koexistenz beider Hypothesen möglich sein, also dass sowohl Mikrodomänen in den Membranen als auch Lipid-Tröpfchen im Zytoplasma zu den Lipidresonanzen beitragen [Ferretti et al. 1999].

Die NMR-sichtbaren mobilen Lipide setzen sich hauptsächlich aus TAG, Cholesterinester und freien Fettsäuren zusammen. Im ^1H -NMR-Spektrum resultiert dies in Resonanzen von Methylgruppen (CH_3) und Methylengruppen (CH_2) sowie von einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäureketten [Di Vito et al. 2001] ([Abbildung 2.3](#)).

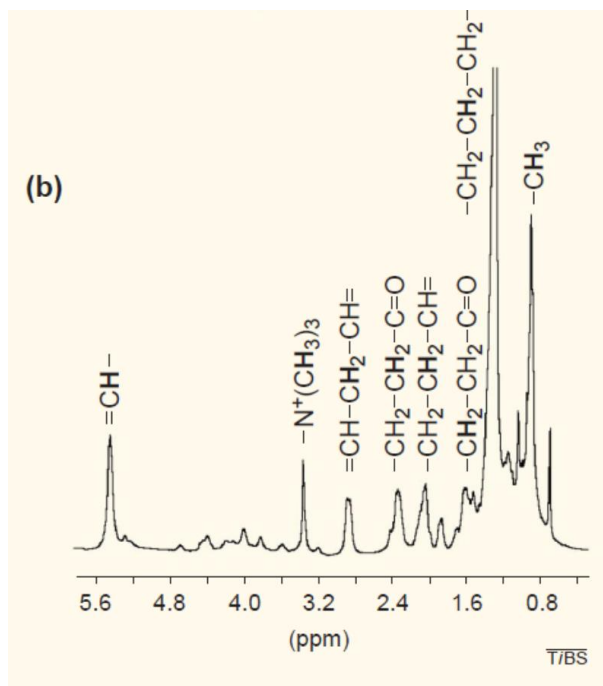


Abbildung 2.3 Typisches ^1H -NMR-Spektrum von mobilen Lipiden. Gezeigt ist das Spektrum von Zellen eines Glioms aus einem Rattengehirn *in vitro*. Neben den zugeordneten Lipidresonanzen ist auch die Cholin Resonanz ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) dargestellt. Entnommen aus Hakumäki & Kauppinen et al. [Hakumäki & Kauppinen et al. 2000]

Quintero et al. [Quintero et al. 2007] versuchten eine Erklärung zu finden, warum die mobilen Lipide nur unter Stressbedingungen sichtbar werden. Demnach werden in proliferierenden Zellen TAG bis zum Verbrauch in kleinen Lipid-Tröpfchen gelagert und in dieser Form zum Verwendungsort (z.B. Mitochondrien) transportiert. Diese Tröpfchen haben einen kleineren Durchmesser als 100 nm und sind damit nicht NMR-detektierbar. Bei einem Wachstumsstopp nimmt der Bedarf und Verbrauch an TAG stark ab, wodurch die Lipid-Tröpfchen zu größeren Tropfen fusionieren und damit NMR-sichtbar werden.

Nach Beloribi-Djefaflija et al. [Beloribi-Djefaflija et al. 2016] nehmen stark proliferierende Tumorzellen zusätzlich zur endogenen Synthese exogene Lipide und Cholesterin auf. Wenn TAG, Phospholipide und Cholesterin schließlich im Überfluss in der Zelle vorhanden sind, werden sie als Lipoproteine hoher Dichte (HDL) exportiert, oder werden, wie zuvor beschrieben, in Lipid-Tröpfchen gelagert. Importierte Lipide können aber auch über die β -Oxidation der Fettsäuren abgebaut und somit zur Energieerzeugung genutzt werden (Abbildung 2.4), was bei Tumorzellen auf Grund der oft eingeschränkten Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen eine besondere Rolle spielen kann [Delikatny et al. 2011].

Untersuchungen mit C6 Gliom-Zellen zeigten, dass die mobilen Lipide auf Grund ihrer Korrelation mit der Proliferationsrate zur Analyse der Veränderung des proliferativen Status einer Tumorzell-Population verwendet werden können [Quintero et al. 2007]. Die NMR-sichtbaren Lipide wurden aber nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in vielen Stamm- und Progenitorzellen unter Stressbedingungen nachgewiesen. Dazu zählen embryonale, neurale und mesenchymale Stammzellen sowie neurale Progenitorzellen und tumorinitiierende Zellen [Ramm Sander et al. 2013].

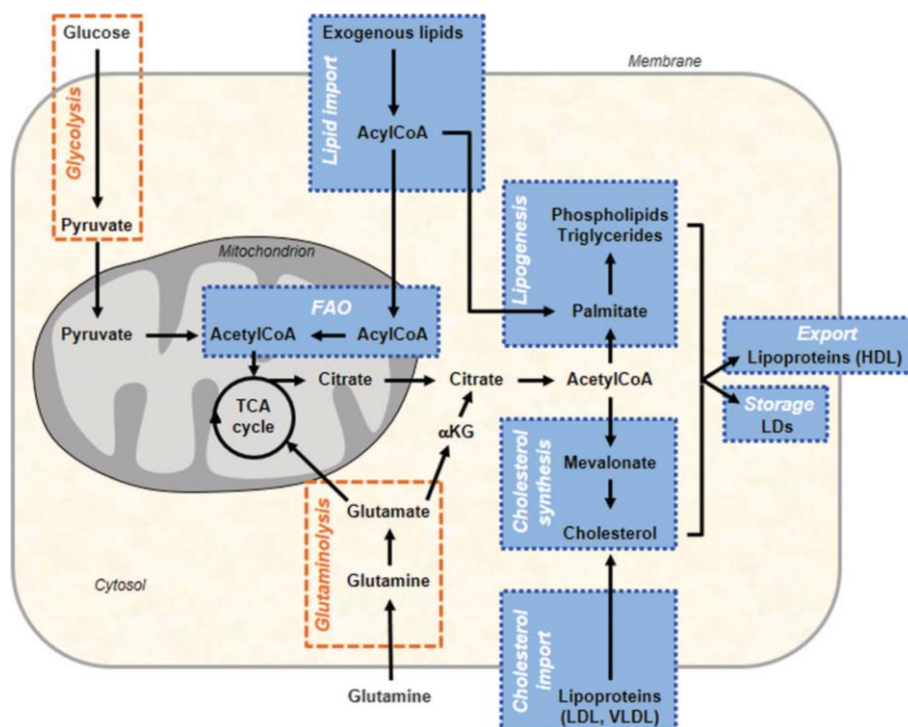


Abbildung 2.4 Vereinfachte Darstellung des veränderten Lipidmetabolismus in Tumorzellen. Tumorzellen können exogene Lipide und Cholesterin aufnehmen. Wenn ein Überschuss an Triacylglycerolen, Phospholipiden und Cholesterin besteht, können diese über Lipoproteine hoher Dichte (HDL) exportiert, oder lokal in Lipid-Tröpfchen gelagert werden. Durch die β -Oxidation der Fettsäuren (FAO) können aufgenommene Lipide auch als Energiequelle genutzt werden. Entnommen aus Beloribi-Djefaflija et al. [Beloribi-Djefaflija et al. 2016].

2.4.3.2 Mobile Proteine

In ^1H -NMR-Spektren sind *in vivo* und *in vitro* zusätzlich zu den vorher erwähnten mobilen Lipidresonanzen weitere breite Resonanzen von Makromolekülen sichtbar. Nach aktuellem Stand der Forschung wird davon ausgegangen, dass es sich dabei um Resonanzen von Proteinen, oder Polypeptiden aus dem Zytosol der Zellen handelt. Bis heute konnte allerdings noch keine genaue Zuordnung der makromolekularen Resonanzen durchgeführt werden. Studien zu diesem Thema finden sich hauptsächlich in den 1990er Jahren von Behar & Ogino [Behar & Ogino 1991; Behar & Ogino 1993], Behar et al. [Behar et al. 1994], Kauppinen et al. [Kauppinen et al. 1992; Kauppinen et al. 1992; Kauppinen et al. 1993] und Kauppinen & Palvimo [Kauppinen & Palvimo 1992]. Seit dieser Zeit wurde weniger versucht, die makromolekularen Resonanzen zu charakterisieren, als sie möglichst gut durch Fit-Modelle, wie LCMoDel [Opstad et al. 2008], aus dem Gesamtspektrum zu subtrahieren, um damit die Genauigkeit der metabolischen Quantifizierung zu verbessern [Schaller et al. 2014; Birch et al. 2017].

Fakt ist, dass sieben breite Resonanzen im spektralen Bereich zwischen 0,9 - 3,0 ppm existieren (M1 - M7) (Abbildung 2.5), welche sich durch kurze T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten auszeichnen [Behar et al. 1994; Behar & Ogino 1991]. Vergleiche der NMR-sichtbaren Resonanzen mit den chemischen Verschiebungen von Random-Coil-Werten (statistisches

Knäul) von Aminosäuren aus Polypeptiden zeigten einige Übereinstimmungen der spektralen Bereiche [Behar et al. 1994]. Hydrolysen von Säureextraktionen zeigten eine Fülle von freien Aminosäuren bei gleichzeitigem Verschwinden der breiten Resonanzen im ^1H -NMR-Spektrum [Kauppinen et al. 1992]. Daraus wurde gefolgert, dass die Ursache der breiten NMR-sichtbaren Resonanzen bewegliche oder teilweise mobile Proteine sind.

Erste Versuche zur Charakterisierung wurden von Kauppinen et al. [Kauppinen et al. 1992] und Kauppinen und Palvimo [Kauppinen & Palvimo 1992] durchgeführt. Sie konnten zeigen, dass mittels Perchlorsäure erstellte Extrakte aus Gehirnen von Säugetieren ebenfalls dieselben breiten Resonanzen im ^1H -NMR-Spektrum zeigten. Auf Grund der Zusammensetzung der Aminosäuren, der ermittelten Molekülmasse und deren hoher Konzentration in den Extrakten schlugen sie die Proteine Thymosin $\beta 4$ und Histon H1 als mögliche Kandidaten vor. Beide Proteine zeigten dabei ^1H -NMR-Spektren, welche Ähnlichkeiten mit den makromolekularen Resonanzen aufwiesen. Auf Grund der kleineren Molekülmasse (ca. 5 kDa) und dessen Lokalisierung im Zytosol legten sich Kauppinen et al. auf Thymosin $\beta 4$ fest. Dies stellt allerdings nur einen ersten Versuch dar, die makromolekularen NMR-sichtbaren NMR-Resonanzen zuzuordnen und zeigt, dass weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet notwendig sind, um die potenziellen Proteine genau zu charakterisieren.

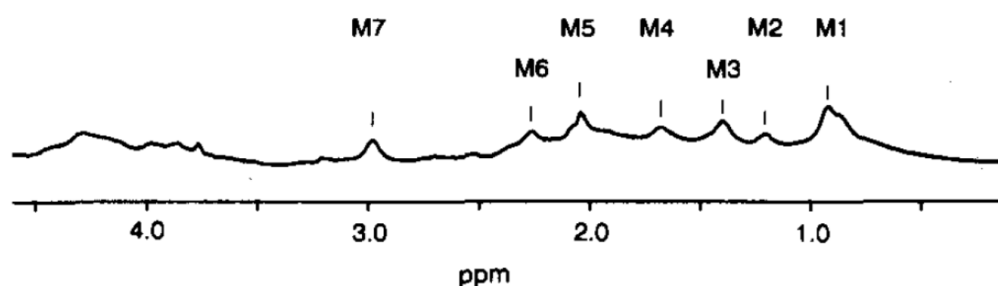


Abbildung 2.5 ^1H -NMR-Spektrum der NMR-sichtbaren mobilen Proteine aus dem Zytosol eines Rattenhirns. Das Zytosol wurde zuvor mittels Dialyse von niedermolekularen Metaboliten befreit. Die Resonanzen wurden mit M1 - M7 bezeichnet, wobei hier M5 durch Glutamat sowie N-Acetyl-Aspartat (NAA) und M7 durch GABA und Kreatin überlagert wurden. Entnommen aus Behar & Ogino [Behar & Ogino 1993].

2.5 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und dessen Behandlung mit einem Antisense Oligonukleotid

Mit zunehmenden Alter nimmt die Stammzellaktivität ab, wodurch auch die Reparaturfähigkeit im Körper eingeschränkt wird [Taupin & Gage 2002]. Bei neurodegenerativen Erkrankungen sind diese Prozesse beschleunigt. Ein Beispiel für eine derartige Erkrankung ist die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), dessen Ursache bis heute noch nicht voll aufgeklärt ist. Ein Grund dafür könnte die Heterogenität dieser Störung sein, wonach eine Vielzahl an Genen involviert sind. ALS kann in jedem Alter auftreten, dabei beträgt die

mittlere Überlebenszeit der Patienten nur 3 - 5 Jahre nach Ausbruch der Krankheit – also ca. 16 Monate nach Diagnosestellung – und nur 10 % der Patienten leben länger als 10 Jahre [Swinen & Robberecht 2014].

Im Falle der ALS werden das erste und zweite Motoneuron geschädigt, welche die Muskulatur des Körpers innervieren, daraus resultiert letztlich ein Muskelabbau [Swinen & Robberecht 2014]. Als Immunantwort des Gehirns werden Mikrogliazellen aktiviert und Zytokine ausgeschüttet, es bildet sich eine Inflammation [Endo et al. 2015]. Eines der ausgeschütteten Zytokine ist der transformierende Wachstumsfaktor beta (TGF-beta, *engl.* transforming growth factor beta), welcher zur Regulierung vieler Funktionen wie Migration, Differenzierung, Apoptose, Bildung der extrazellulären Matrix und zur Inflammation beiträgt. TGF-beta hemmt aber auch die Proliferation neuraler Stamm- und Progenitorzellen, wodurch der Fortschritt der neurodegenerativen Krankheit zusätzlich verstärkt wird [Aigner & Bogdahn 2008].

Aktuell wird zur Behandlung der ALS als neuer Therapieansatz der Einsatz von Antisense Oligonukleotiden erforscht. Diese Oligonukleotide sind synthetische einzelsträngige Ketten von Nukleinsäuren mit einer Länge zwischen 8 und 50 Nukleotiden. Sie können durch die Bindung an die RNA die Expression von Proteinen beeinflussen. Die Zugabe des Oligonukleotids muss dabei lokal erfolgen, da die Blut-Hirn-Schranke nicht ohne weiteres von den Nukleinsäureketten passiert werden kann [Evers et al. 2015].

Eine mögliche Strategie zur Behandlung der ALS erfolgt durch die Beeinflussung des TGF-beta Signalwegs über ein Antisense Oligonukleotid. TGF-beta besitzt drei Isoformen: TGF-beta1, TGF-beta2 und TGF-beta3. Alle drei Isoformen binden an den Rezeptor TGFRII auf der Zelloberfläche ([Abbildung 2.6](#)). Nach Bindung von TGF-beta bindet der Rezeptor TGFRII an den Rezeptor TGFRI, welcher nach seiner Aktivierung SMAD-Proteine phosphoryliert. SMAD-Proteine werden in insgesamt drei Klassen eingeteilt. Eine Gruppe wird durch die Rezeptor-regulierenden R-SMAD-Proteine gebildet (SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 und SMAD8), eine weitere Gruppe durch Komplex Co-SMAD-Proteine (SMAD4) und die dritte Gruppe durch Inhibitor I-SMAD-Proteine (SMAD6 und SMAD7). Aktivierte R-SMAD-Proteine bilden zusammen mit den SMAD4 Proteinen einen Komplex, der in den Zellkern eindringen kann und dort die Gentranskription beeinflusst [Aigner & Bogdahn 2008]. Im Falle des Antisense Oligonukleotids zur Behandlung der ALS wird die Expression des Rezeptor-Proteins TGFRII reduziert, woraus eine Verminderung des Rezeptors an der Zelloberfläche resultiert. Dadurch wird die Hemmung der Proliferation der neuralen Stamm- und Progenitorzellen wieder aufgehoben und der Verlauf der Krankheit verlangsamt. In ALS-Mäusen konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Unterbrechung des TGF-beta Signalwegs zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufs führt [Endo et al. 2015].

TGF-beta ist auf Grund seiner zahlreichen Funktionen für den gesamten Organismus von großer Bedeutung. Daher muss eine Behandlung mit dem Antisense Oligonukleotid durch eine direkte, lokale Zugabe in die subventrikuläre Zone (SVZ) erfolgen, um hauptsächlich die dort befindlichen neuralen Stamm- und Progenitorzellen zu beeinflussen und die Neurogenese neu zu starten. Damit ist zugleich gewährleistet, dass der restliche Organismus weiter von den vielfältigen positiven Eigenschaften des TGF-betas profitieren kann.

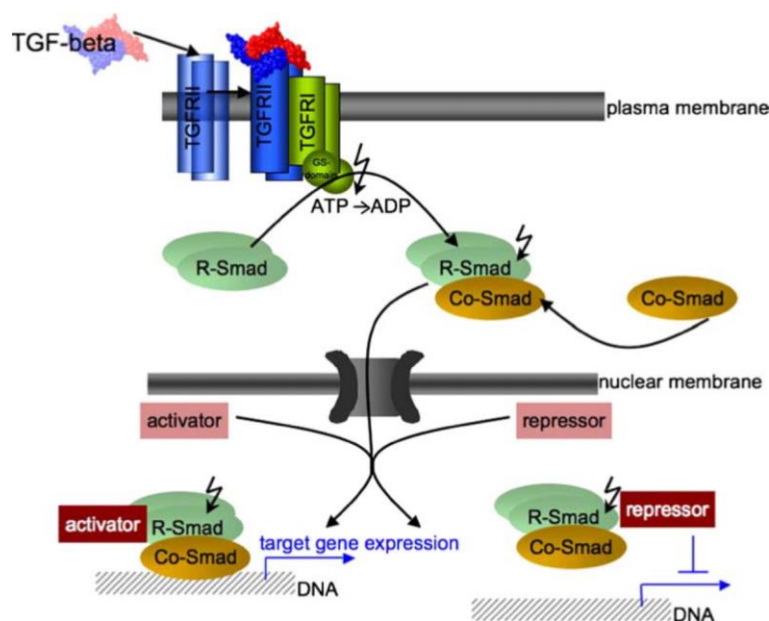


Abbildung 2.6 Schematisch dargestellter TGF-beta Signalweg über SMAD-Proteine. TGF-beta bindet an den Rezeptor TGFRII, welcher dann den Rezeptor TGFRI aktiviert. Dies induziert die SMAD Signal Transduktion, wodurch letztlich die Genexpression im Zellkern beeinflusst wird. Entnommen aus Aigner & Bogdahn [Aigner & Bogdahn 2008].

2.6 Aminosäuren

Die Abkürzungen der Aminosäuren im Dreibuchstabencode in dieser Arbeit entsprechen der Nomenklatur gemäß der „International Union of Pure and Applied Chemistry“ (IUPAC).

Die entsprechenden Protonen-NMR-Spektren der jeweiligen Aminosäuren können zum Beispiel in der „Human Metabolome Database“ (HMDB) [Wishart et al. 2013] nachgeschlagen werden (www.hmdb.ca).

Tabelle 2.1 Die 20 Aminosäuren und deren entsprechende Abkürzung im Dreibuchstabencode. Die Auflistung erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

Aminosäure	Abkürzung	Aminosäure	Abkürzung
Alanin	Ala	Leucin	Leu
Arginin	Arg	Lysin	Lys
Asparagin	Asn	Methionin	Met
Aspartat	Asp	Phenylalanin	Phe
Cystein	Cys	Prolin	Pro
Glutamin	Gln	Serin	Ser
Glutamat	Glu	Threonin	Thr
Glycin	Gly	Tryptophan	Trp
Histidin	His	Tyrosin	Tyr
Isoleucin	Ile	Valin	Val

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden zunächst die Komponenten des Perfusions-Systems aufgelistet und näher beschrieben. Des Weiteren wird auf die untersuchten Zelllinien eingegangen und die Methoden zur Sterilisation und Einbettung der Zellen in ein Agarosegel beschrieben. Weiterhin werden die verwendeten Verfahren zur Messung des pH-Werts und des Sauerstoffgehaltes innerhalb der Perfusionskammer erläutert und schließlich die NMR-relevanten Parameter angegeben.

3.1 Aufbau des Perfusions-Systems

Die Grundidee eines Perfusions-Systems an einem Kernspinresonanz-Spektrometer war eine Methode zur nicht invasiven Beobachtung des Metabolismus lebender Zellen zu schaffen. Dazu wurde ein System aufgebaut, welches in der Lage ist die Zellen bei kontinuierlicher Aufnahme von Spektren mit einem Medium zu versorgen und dabei die Bedingungen in der Perfusionskammer zu überwachen ([Abbildung 3.1](#)). Das Perfusionsmedium wird dazu in einem maßgefertigten Inkubator bei 37 °C über einen gasdurchlässigen Schlauch begast. Die Peristaltik-Pumpe, welche ebenfalls im Inkubator positioniert ist, leitet das Medium über Edelstahl-Kapillarrohre in die Perfusionskammer innerhalb des 800 MHz-NMR-Spektrometers. Dort befinden sich die zu untersuchenden Zellen, welche durch Einbettung in einem Faden aus Agarosegel immobilisiert sind. Das verbrauchte Medium aus der Perfusionskammer kann in einem Auffangbehälter außerhalb des Spektrometers aufgefangen werden und steht somit für eine metabolische Analyse zur Verfügung. In der Zu- und Ableitung der Perfusionskammer befinden sich zusätzlich noch Temperatur- und Sauerstoffsensoren, durch die eine exakte Einstellung des Sauerstoffgehaltes im System sowie die Analyse des Sauerstoffverbrauchs der Zellen möglich ist. Zudem können Additive durch einen Injektor in die Perfusionskammer zugeleitet werden und im Ablauf besteht außerdem die Möglichkeit einer Probenentnahme. Die einzelnen Bestandteile des Systems werden im Folgenden genau beschrieben.

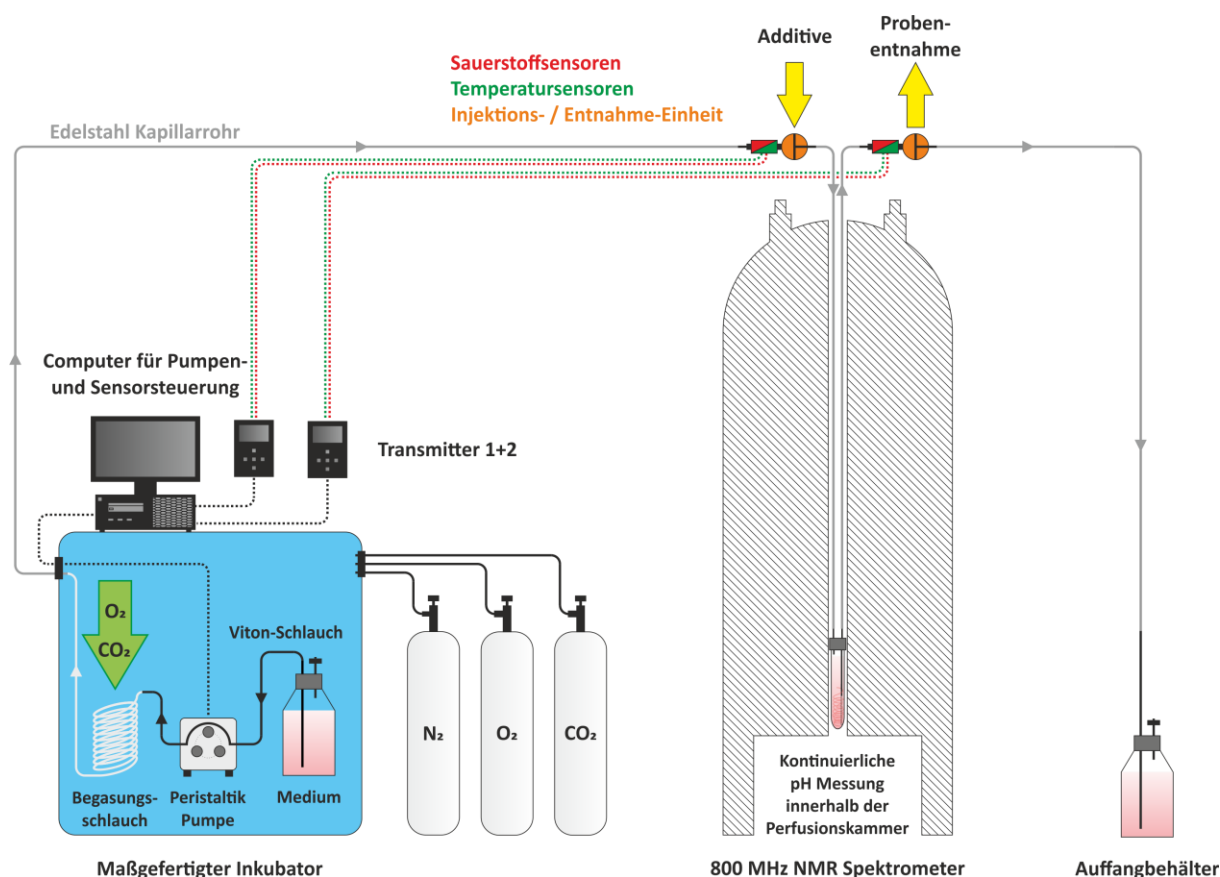


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau des Perfusions-Systems. Das Perfusionsmedium wird in einem Inkubator bei 37 °C über einen gasdurchlässigen Schlauch begast und über Edelstahl-Kapillarrohre in die Perfusionskammer gepumpt, welche in einem hochauflösenden 800 MHz-NMR-Spektrometer positioniert ist. In der Perfusionskammer befinden sich in einem Faden aus Agarosegel eingebettete Zellen, welche durch die kontinuierliche Zufuhr an frischem Medium mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Das verbrauchte Medium kann in einem Auffangbehälter gesammelt, oder über eine Einrichtung zur Probenentnahme in Fraktionen manuell entnommen werden. Zudem können über eine Injektionseinheit Additive während einer Messung in die Perfusionskammer zugegeben werden. Während einer Perfusionsmessung können sowohl der Sauerstoffgehalt als auch der pH-Wert kontinuierlich gemessen und bei Bedarf variiert werden.

3.1.1 Materialien des Leitungssystems

Ein Überblick über die Bestandteile des Perfusions-Systems und deren Eigenschaften wird in [Tabelle 3.1](#) gegeben. Die Begasung des Mediums wird durch einen gaspermeablen Silikon-Schlauch (*Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH*, Deutschland) realisiert, durch welchen das Medium über eine Peristaltik-Pumpe gepumpt wird. Dieser Silikon-Schlauch hat eine Länge von 3,2 m und einen Innendurchmesser sowie eine Wandstärke von 1 mm. Zudem wurden noch insgesamt etwa 1,1 m des Silikon-Schlauchs für die Zu- und Ableitungen zu den Gefäßen verwendet. Der Grund dafür war hauptsächlich, dass die Silikon-Schläuche transparent sind und somit der Fluss des Mediums und eventuelle Blasen im System beobachtet werden konnten. Der größte Teil des Perfusions-Systems besteht aus Edelstahl-Kapillarrohren (*B.E.S.T. Fluidsysteme GmbH*, Deutschland). Die Metallrohre bestehen aus nicht magnetisierbarem, nicht rostendem und biokompatiblen Edelstahl (WNr. 1.4435). Der Innendurchmesser der

Rohre beträgt 0,0345 " (ca. 0,88 mm) und die Wandstärke 0,014 " (ca. 0,36 mm). Die gesamte Länge der verbauten Metallrohre beträgt ca. 21,25 m. Zur Verbindung der Sensoren mit den Edelstahl-Kapillarrohren und der Zu- und Ableitung der Perfusionskammer werden Schläuche aus Viton verwendet (*Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH*, Deutschland). Dieses Material hat eine geringe Gasdurchlässigkeit ($1,4 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s} \cdot \text{cmHg}$ für O_2) und ist chemisch sehr resistent. Insgesamt sind im Perfusions-System etwa 2 m davon verbaut. Der Innendurchmesser sowie die Wandstärke des Viton-Schlauchs beträgt ebenfalls 1 mm.

Tabelle 3.1 Auflistung der Bestandteile des Perfusions-Systems unter Angabe des Innendurchmessers (ID), der Länge und des Volumens. Die Gesamtlänge des Leitungssystems beträgt ca. 27,6 m. Das Gesamtvolumen des Perfusions-Systems inklusive Perfusionskammer beläuft sich auf etwa 22 ml.

Abschnitt	Material	ID [mm]	Länge [m]	Volumen [ml]
Ableitung Gefäß	Silikon	1,00	0,600	0,47
Pumpe	Viton	1,00	0,220	0,17
Begasung	Silikon	1,00	3,190	2,51
Kapillarrohr	Edelstahl	0,88	9,700	5,85
Verbindung 1	Viton	1,00	0,080	0,06
O₂- / T-Sensor 1				
Verbindung 2	Viton	1,00	0,060	0,05
Injektionseinheit (3WH_1 – 3WH_5)				
Verbindung 3	Viton	1,00	0,060	0,05
Kapillarrohr	Edelstahl	0,88	0,350	0,21
Verbindung 4	Viton	1,00	0,030	0,02
Dreiwegehahn (3WH_6)				
Verbindung 5	Viton	1,00	0,030	0,02
Kapillarrohr	Edelstahl	0,88	2,400	1,45
Zuleitung PK	Viton	1,00	0,050	0,04
Perfusionskammer (PK)				
Ableitung PK 1	Glas	0,80	0,050	0,03
Ableitung PK 2	Viton	1,00	0,190	0,15
Kapillarrohr	Edelstahl	0,88	2,400	1,45
Verbindung 6	Viton	1,00	0,030	0,02
Dreiwegehahn (3WH_7)				
Verbindung 7	Viton	1,00	0,030	0,02
Kapillarrohr	Edelstahl	0,88	0,350	0,21
Verbindung 8	Viton	1,00	0,120	0,09
O₂- / T-Sensor 2				
Verbindung 9	Viton	1,00	0,040	0,03
Dreiwegehahn (3WH_8)				
Verbindung 10	Viton	1,00	0,040	0,03
Kapillarrohr	Edelstahl	0,88	6,050	3,65
Verbindung 11	Viton	1,00	1,050	0,82
Zuleitung Gefäß	Silikon	1,00	0,450	0,35

Damit ergibt sich eine gesamte Länge des Leitungssystems von ca. 27,6 m, über die sich das Rohr- und Schlauchsystem erstreckt. Die Notwendigkeit dieser Länge ergab sich aus dem

Sicherheitsabstand für technische Geräte, wie Pumpe oder Inkubator, welcher auf Grund des starken Magnetfelds um das Spektrometer eingehalten werden muss. Das gesamte Volumen der Zu- und Ableitungen beträgt etwa 17,8 ml. Dazu kommt noch das Volumen der Perfusionskammer, der Sensoren und der Injektionseinheit, so dass sich ein Gesamtvolumen von ca. 22 ml ergibt.

3.1.2 Inkubator

Das Medium für die Versorgung der Zellen wird in einem Kühlbrutschrank (KB240; *Binder GmbH*, Deutschland) auf 37 °C erwärmt. Außerdem wird die Begasung des Mediums durch den gaspermeablen Silikon-Schlauch über die O₂- und CO₂-Regelung des Inkubators gesteuert, wobei zur Einstellung der gewünschten Gaszusammensetzung auch N₂ zur Regelung verwendet wurde. Die CO₂-Begasung wird dabei zur Einstellung des pH-Wertes des Mediums benötigt, da das verwendete Medium einen Natriumhydrogencarbonat-Puffer (NaHCO₃) besitzt. Der verwendete Kühlbrutschrank hat einen einstellbaren Temperaturbereich von -10 bis + 80 °C, einen O₂-Sollwert von 0 bis 90 % und einen CO₂-Sollwert von 0 bis 20 %. Zudem ist der Inkubator derart modifiziert, dass im Innenraum eine Pumpe betrieben und das Edelstahl-Kapillarrohr, zum Transport des Mediums, durch eine Seitenwand nach außen geleitet werden kann, ohne dass die Dichtheit des Inkubators dadurch beeinträchtigt wird.

3.1.3 Peristaltik-Pumpe

Die Pumpe, welche das Medium aus dem Inkubator zu den Zellen leitet, ist im Inkubator positioniert. Es handelt sich dabei um eine Peristaltik-Pumpe (IPC ISM930C; *Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH*, Deutschland) mit einer möglichen Pump-Rate von 57 µl/min bis 5,7 ml/min, bei einem verwendeten Schlauch-Innendurchmesser von 1 mm. Die Pumpe ist durch eine serielle Schnittstelle (RS232) über ein firmeneigenes Programm mit einem Rechner steuerbar. Dadurch kann die Pumpensteuerung von außen ohne Öffnen des Inkubators erfolgen, was vor allem bei hypoxischen Messungen von Vorteil ist und zudem auch einen konstanten CO₂-Gehalt und somit einen konstanten pH-Wert über die gesamte Dauer der Messung ermöglicht.

3.1.4 Perfusionskammer

Die Perfusionskammer besteht aus einem NMR-Glasröhrchen mit Schraubverschluss (*Deutero GmbH*, Deutschland), welches einen Innendurchmesser von ca. 4 mm besitzt (**Abbildung 3.2**). Die Länge der Perfusionskammer beträgt 19 cm und sie hat ein gesamtes Innenvolumen von ca. 3 ml. Die Schraubkappe wurde zweimal durchbohrt, so dass zwei Viton-Schläuche mit einem Innendurchmesser und einer Wandstärke von 1 mm in die Perfusionskammer eingeführt werden konnten. Der kürzere, ca. 5 cm lange Schlauch, welcher bereits etwa 1 cm unterhalb der Kappe endet, dient dabei der Zuleitung vom Medium in die Perfusionskammer.

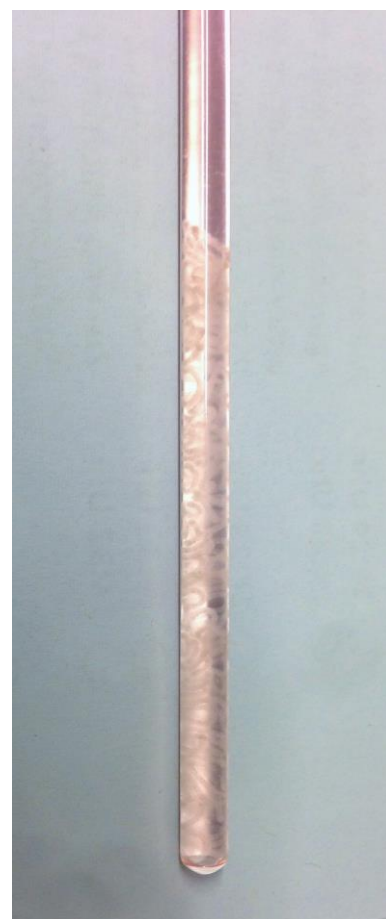
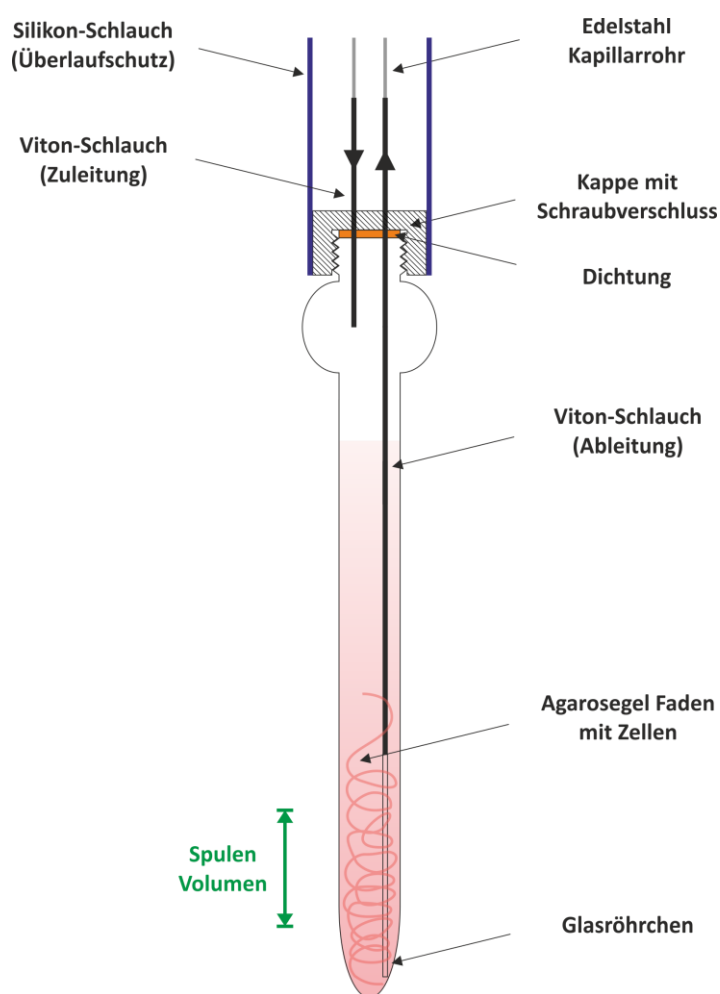


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der Perfusionskammer und Bild von einem Faden aus Agarosegel inklusive der darin eingebetteten Zellen in der Perfusionskammer. **Links:** Das Medium wird von oben zugeleitet, fließt am Agarosefaden mit den Zellen vorbei und wird am unteren Ende der Kammer wieder abgeleitet. Im Bereich des Agarosefadens besteht die Ableitung aus einem Glaskapillarröhrchen, um die magnetische Homogenität zu verbessern. Die Perfusionskammer ist über eine in der Kappe angebrachte Dichtung gasdicht verschließbar. An der Kappe ist ein Silikon-Schlauch verklebt, welcher notfalls als Überlaufschutz dient und das Spektrometer vor Schäden durch Flüssigkeitsaustritt schützt. **Rechts:** 0,5%iger Agarosefaden mit 6 Millionen eingebetteten Zellen in der Perfusionskammer mit Medium ohne Viton-Schlauch.

Der längere, ca. 19 cm lange Schlauch, wird zur Ableitung des Mediums verwendet. An dessen unteren Ende befindet sich ein etwa 5 cm langes Glaskapillarröhrchen, welches einen Innendurchmesser von ca. 0,8 mm hat. Dieses Röhrchen dient zur Verbesserung der magnetischen Homogenität im Messbereich. Außerdem reduziert der etwas kleinere Innendurchmesser die Gefahr, dass der Agarosefaden mit den Zellen aus der Kammer gespült wird. Die Viton-Schläuche sind mit einem Zwei-Komponenten Kleber mit der Kappe gasdicht verklebt. An der Innenseite der Kappe ist zudem eine Dichtung angebracht, wodurch die Perfusionskammer ebenfalls gasdicht mit der Kappe verschlossen werden kann.

Der Vorteil einer Zuleitung des Mediums von oben ist, dass Gasblasen, welche sich im System auf Grund von Druck- und Temperatureffekten bilden können, vom Messbereich ferngehalten werden. Die Gasblasen können sich bei dieser Konstruktion somit im oberen Bereich der Perfusionskammer ansammeln. Dadurch entfällt die Notwendigkeit einer Blasenfalle, welche das Gesamtvolumen weiter vergrößert hätte. Gasblasen im Agarosegel würden die magnetische Homogenität im schlimmsten Fall derartig beeinträchtigen, dass die Spektren unbrauchbar werden. Der Nachteil der Ableitung von unten ist, dass der Agarosefaden unter Umständen ausgespült werden kann. Das Risiko wird allerdings durch den kleineren Durchmesser des Glaskapillarröhrchens und einer niedrigen Perfusionsrate deutlich verringert.

Als Überlaufschutz innerhalb des Spektrometers dient ein an der Kappe der Perfusionskammer durch Klebstoff befestigter Silikon-Schlauch. Diese Vorsichtsmaßnahme wurde ergriffen, damit im Falle einer Undichtheit der modifizierten Kappe kein Schaden am Spektrometer durch Flüssigkeitsaustritt entsteht. Der verwendete Silikon-Schlauch hat eine Länge von ca. 2,3 m und einen Innendurchmesser von 8 mm. In diesem Silikon-Schlauch befinden sich die Kapillarrohre der Zu- und Ableitung. In einer Höhe von ca. 1,7 m über der Perfusionskammer befindet sich eine Öffnung, über die Medium, welches an der Kappe austreten könnte, aus dem Spektrometer abgeleitet werden kann.

Am oberen Ende der Kapillarrohre ist jeweils ein Dreiwegehahn über ein Viton-Schlauchstück angeschlossen (siehe [Tabelle 3.1](#), 3WH_6 und 3WH_7). Diese beiden Dreiwegehähne werden benötigt um die Zu- und Ableitung der Perfusionskammer zu verschließen, damit die Perfusionskammer in das Spektrometer eingeführt oder daraus entnommen werden kann.

3.1.5 Sauerstoff- und Temperatursensoren

Zur Bestimmung des Sauerstoffgehaltes werden je eine O₂-Durchflussszelle (PSt3; *PreSens Precision Sensing GmbH*, Deutschland) in der Zu- und Ableitung der Perfusionskammer verwendet. Die Durchflussszellen bestehen jeweils aus einem T-Stück aus Polypropylen mit einem Innendurchmesser von ca. 4 mm und drei weiblichen Luer-Lock Anschlüssen. In diesem T-Stück ist ein zylindrischer Hohlkörper aus Glas eingepasst, auf dessen Innenseite eine Sensorschicht aufgetragen ist, welche über einen Lichtleiter, in der Mitte des T-Stücks, optisch angeregt werden. An den beiden anderen Enden des T-Stücks sind männliche Luer-Lock

Schlauchadapter (*Reichert Chemietechnik GmbH + Co.*, Deutschland) aus Polypropylen angeschlossen. Zwischen den Schlauchadaptern und dem zylindrischen Glashohlkörper in der Mitte ist jeweils ein Viton-Dichtring eingesetzt. Das Volumen innerhalb einer Durchflusszelle beträgt $100 \pm 10 \mu\text{l}$. Die O_2 -Durchflusszellen haben einen Messbereich von 0 bis 100 % O_2 , bei einer Genauigkeit von 0,4 % O_2 bei 20,9 % O_2 und 0,05 % O_2 bei 0,2 % O_2 .

Die Bestimmung des Sauerstoffgehaltes wird durch die optische Anregung der Sensorschicht erreicht, wobei dessen Luminophor in ein energetisch höheres Niveau gehoben wird. Ohne Sauerstoff würde der angeregte Luminophor dann unter Emission von Licht in den Grundzustand übergehen. Dieses emittierte Licht ist die optische Antwort der Sensorschicht. In Gegenwart von Sauerstoff wird jedoch durch „Quenching“ die Anregungsenergie des Luminophors auf die Sauerstoffmoleküle im Medium übertragen. Umso mehr Sauerstoffmoleküle im Medium vorhanden sind, desto mehr Energieüberträge aus der Sensorschicht finden statt und die optische Antwort des Sensors wird in ihrer Intensität verringert. Die optische Anregung und der Empfang der optischen Antwort erfolgt jeweils über einen Transmitter (Fibox 4; *PreSens Precision Sensing GmbH*, Deutschland), welcher über einen 10 m langen Lichtleiter mit einer Durchflusszelle verbunden ist. Die Transmitter senden die empfangenen Daten jeweils via Universal Serial Bus (USB) an einen Rechner. Dort können die Transmitter über die Software „PreSens Measurement Studio“ (*PreSens Precision Sensing GmbH*, Deutschland) gesteuert und die empfangenen Daten aufgezeichnet werden. Die Transmitter verfügen zusätzlich über ein internes Barometer, über das Schwankungen des Luftdrucks bei der Sauerstoffmessung durch eine automatische Korrektur ausgeglichen werden können. Der Messbereich des Barometers liegt dabei zwischen 10 bis 1200 mbar bei einem Fehler von $\pm 1,5$ mbar.

Zudem korrigieren die Transmitter auch automatisch Temperaturschwankungen während der Sauerstoffmessung. Dazu ist jeweils ein Pt100 Sensor (Platin-Messwiderstand mit Nennwiderstand $R_0 = 100 \Omega$) (*Temperatur Messelemente Hettstedt GmbH*, Deutschland) mit 4-Leiter Schaltung über ein abgeschirmtes, 11 m langes Kabel an einem Transmitter angeschlossen. Die Pt100 Sensoren haben einen Durchmesser von 1,5 mm, bei einer Fühlerlänge von 40 mm, wobei die minimale Eintauchtiefe 5 mm beträgt. Die vom Hersteller angegebene Genauigkeit des Sensors beträgt 0,4 °C und der Messbereich liegt zwischen 0 bis 50 °C.

Die Daten von Sauerstoff-, Luftdruck- und Temperatursensoren können mit Hilfe der Software in frei einstellbaren Intervallen aufgezeichnet und gespeichert werden (kürzestes Intervall: 1 s). Als sinnvolles Intervall ergab sich bei den Messungen in dieser Arbeit eine Zeitspanne von 10 min.

3.1.6 Sensoranordnung und Injektionseinheit

In Flussrichtung betrachtet wird nach dem Inkubator zuerst der O_2 -Sensor im Zulauf der Perfusionskammer durchflossen ([Abbildung 3.3](#)). Dieser ist über einen Viton-Schlauch mit dem

Edelstahl-Kapillarrohr des Inkubators verbunden. Der Temperatursensor ist außen am O₂-Sensor fixiert. Beide Sensoren sind an einem Ausleger aus nicht magnetisierbarem Edelstahl befestigt, welcher in der mechanischen Werkstatt der Fakultät für Biologie und Vorklinischer Medizin der Universität Regensburg angefertigt wurde. Nach dem Sauerstoff- und Temperatursensor folgt bei Bedarf die Injektionseinheit. Bei Messungen ohne Injektion wird der Sauerstoff-Sensor über ein Stück Viton-Schlauch direkt mit dem nachfolgenden Kapillarrohr, welches zur Perfusionskammer führt, verbunden.

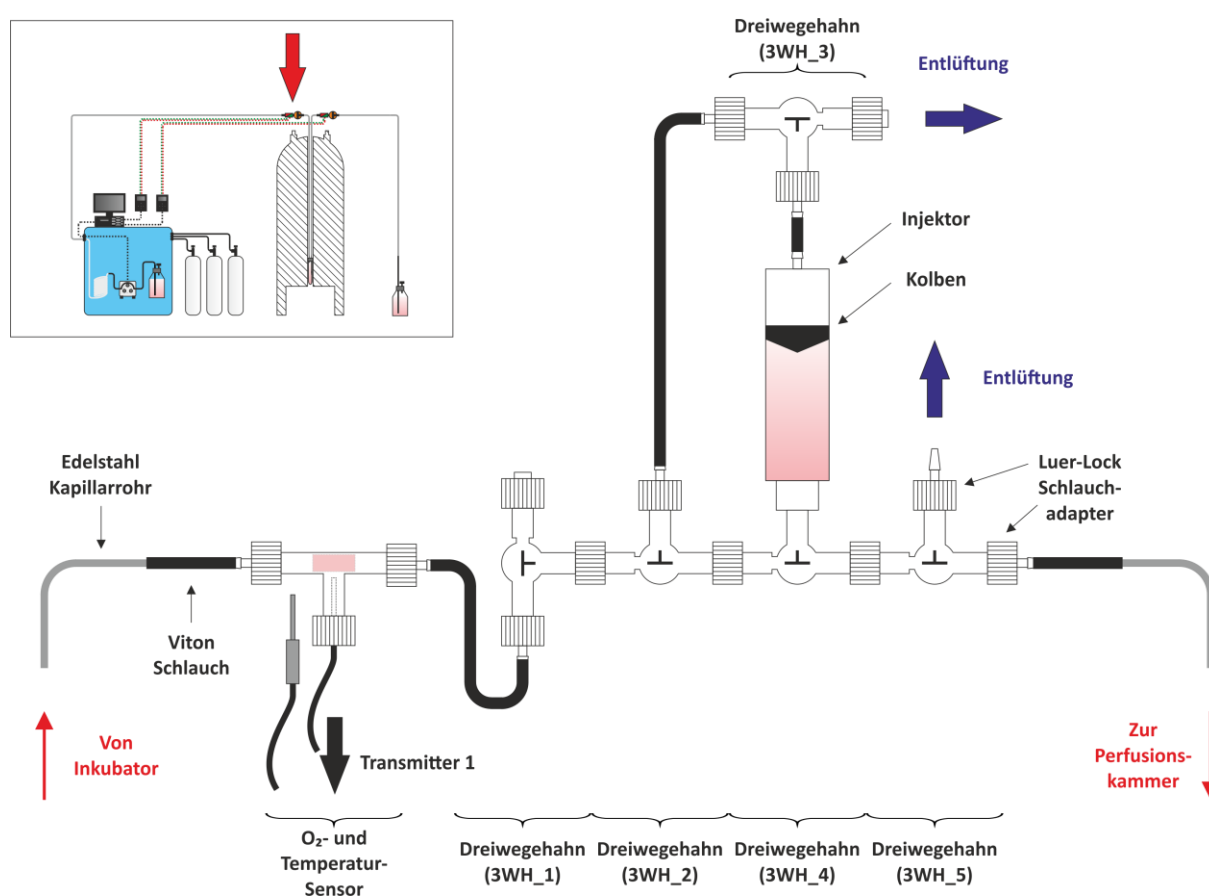


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung der Sensoren und der Injektionseinheit im Zulauf der Perfusionskammer. Das Medium durchläuft den Sauerstoffsensor und läuft bei nicht verwendetem Injektor direkt in Richtung Perfusionskammer. Bei Verwendung des Injektors wird dieser zunächst unter sterilen Bedingungen mit einem Additiv befüllt und dann an der Injektionseinheit angeschlossen. Durch Umleitung des Mediums an 3WH_2 wird der obere Teil des Injektors befüllt und das Additiv kann nach Entlüftung in die Perfusionskammer geleitet werden. Nach der vollständigen Injektion wird das Medium wieder direkt in die Perfusionskammer geleitet.

Die Injektionseinheit besteht im Wesentlichen aus fünf Dreiwegehähnen (*B. Braun Melsungen AG, Deutschland*) und dem Injektor. An den Enden der Injektionseinheit sind männliche Luer-Lock Schlauchadapter (*Reichert Chemietechnik GmbH + Co., Deutschland*) befestigt. Der Injektor selbst ist eine modifizierte 5 ml Luer-Lock Spritze (weiblich) (*B. Braun Melsungen AG, Deutschland*), welche zusammen mit einem Teil einer 10 ml Luer-Lock Spritze (männlich) (*Becton Dickinson GmbH, Deutschland*) ein geschlossenes Volumen bildet. Als Kolben wurde der elastische Kunststoffkolben der 5 ml Spritze verwendet. Die Verbindungsstelle der

Spritzen wurde passgenau gestaltet, so dass das Innenvolumen des Injektors gasdicht abschließt. Damit besitzt der Injektor an einem Ende einen weiblichen und am anderen Ende einen männlichen Luer-Lock Anschluss und im Inneren einen Kolben aus elastischem Kunststoff.

Bei eingebautem Injektor fließt das Medium vor der Injektion zunächst durch alle vier eingebauten Dreiwegehähne (3WH_1, 3WH_2, 3WH_4 und 3WH_5) in Richtung Perfusionskammer. Der Injektor selbst wird sterilisiert und unter sterilen Bedingungen mit einem Additiv befüllt. Anschließend wird der Injektor über den weiblichen Luer-Lock Anschluss an der Injektionseinheit befestigt (3WH_4). Über einen weiteren Dreiwegehahn (3WH_3) wird der Injektor mittels eines Viton-Schlauchs mit dem Dreiwegehahn 3WH_2 verbunden. Bei laufender Perfusion kann durch Umleitung des Flusses bei 3WH_2 der Injektor angesteuert werden. Dabei ist der Dreiwegehahn 3WH_3 zunächst so gestellt, dass die im Viton-Schlauch enthaltene Luft entweichen kann. Nachdem das Medium bei 3WH_3 angekommen ist, wird dieser Dreiwegehahn umgestellt, so dass das Medium in die obere Kammer des Injektors geleitet wird. Dadurch wird der Kolben mit der eingestellten Pump-Rate in Bewegung gesetzt und die Injektion beginnt. Durch Umstellung der Dreiwegehähne 3WH_4 und 3WH_5 kann dann die Luft, welche durch den Anschluss des Injektors an die Einheit eingeschlossen wurde, bei 3WH_5 entweichen. Anschließend kann letzterer Dreiwegehahn dann wieder zurückgestellt werden, so dass das Additiv in die Perfusionskammer fließt. Nach Beendigung der Injektion werden alle Dreiwegehähne in die Ursprungsstellung gebracht und das Medium aus dem Startbehälter fließt dann wieder ohne Unterbrechung in die Perfusionskammer. Der Injektor hat ein Fassungsvermögen von 5 ml. Das Volumen der Zuleitung bis zur Perfusionskammer nach dem Injektor beträgt zusammen mit dem befüllten Volumen der Perfusionskammer selbst etwa 4 ml. Durch diese relativ kleinen Volumina werden die finanziellen Ausgaben selbst beim Einsatz kostenintensiver Additive geringgehalten.

Nach der Perfusionskammer und dessen Ableitung ist das zweite Sensorpaar bestehend aus Sauerstoff- und Temperatursensor eingebaut ([Abbildung 3.4](#)). Sie sind ebenfalls am Ausleger befestigt und befinden sich auf der dem ersten Sensorpaar gegenüberliegenden Seite. Die Sensoren sind mit einem zweiten Transmitter verbunden, welcher die Daten an den Rechner leitet. Somit können die beiden Sensorpaare über einen Rechner gesteuert und die Daten zentral gespeichert werden.

Dem zweiten Sensorpaar folgt ein letzter Dreiwegehahn (3WH_8). Dieser Hahn wird benötigt, damit das Medium beim Abtrennen der Perfusionskammer nicht in den Auffangbehälter, welcher tiefer positioniert ist, zurückläuft. Dadurch würde sonst Luft in die Ableitung gesaugt, wodurch die Sterilität des Systems nicht mehr gewährleistet wäre. Der Dreiwegehahn wird somit während des Einbaus der Perfusionskammer in das Spektrometer als Absperrhahn verwendet. Zudem besteht die Möglichkeit einer manuellen Fraktionssammlung an diesem Dreiwegehahn. Dazu wird eine Kanüle mittels Luer-Lock Anschluss mit dem unteren Ende des Hahns (3WH_8) verbunden. Zur Probenentnahme wird ein Fraktionsfläschchen verwendet, dessen Kappe eine Membran besitzt, welche mit der Kanüle durchstoßen werden kann. Da die Membran nach dem Einführen der Kanüle sehr gut abdichtet, dient ein Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 0,8 mm dem Druckausgleich im Fläschchen während des

Befüllens. Durch entsprechende Stellung des Dreiwegehahns kann somit manuell zu beliebigen Zeitpunkten eine Probe entnommen werden.

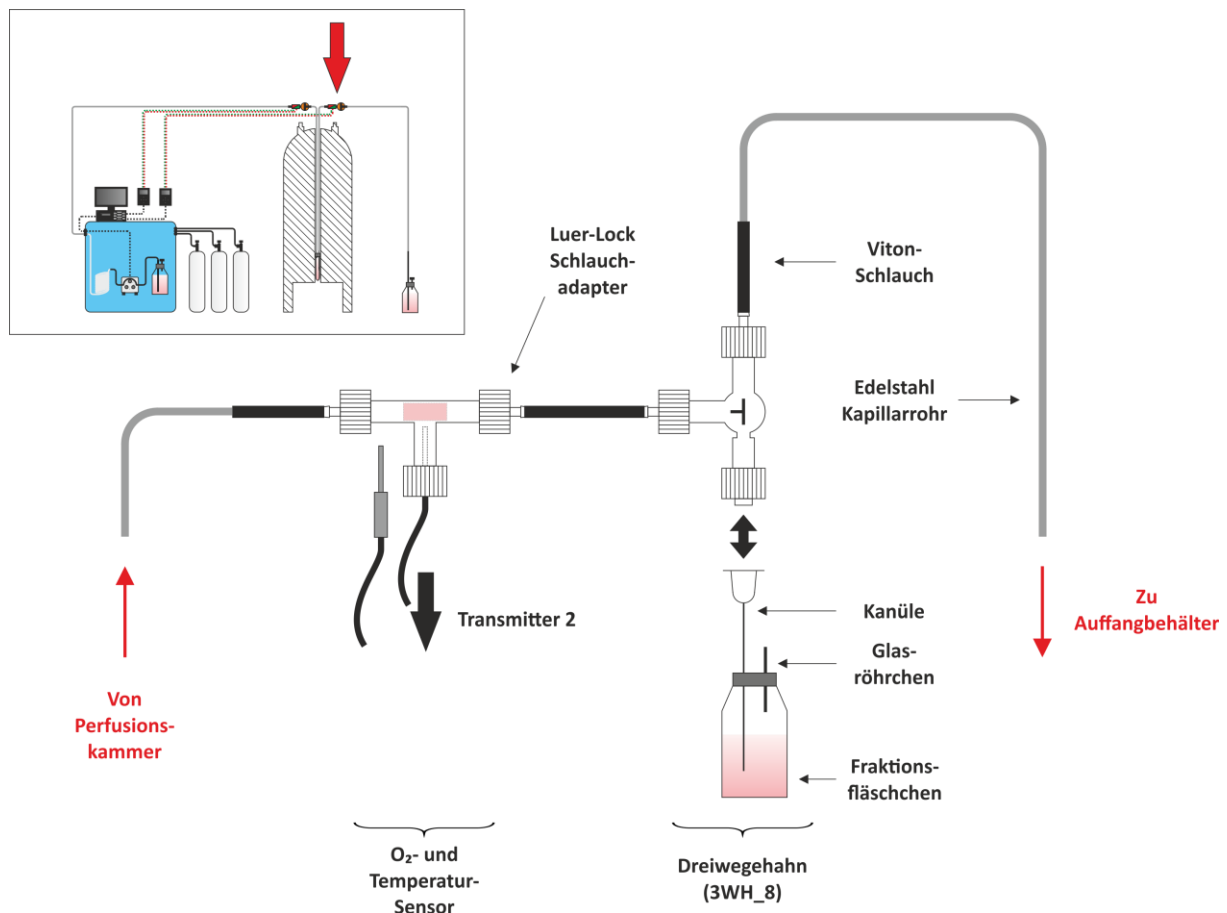


Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Sensoren im Ablauf der Perfusionskammer. Nach der Perfusionskammer durchläuft das Medium den zweiten Sauerstoffsensor und anschließend einen Dreiwegehahn. Dieser Hahn wird bei der Installation der Perfusionskammer zur Absperrung des Leitungssystems benötigt und kann bei laufender Perfusion zur manuellen Fraktionssammlung durch Anschluss einer Kanüle an den Luer-Lock Anschluss am Dreiwegehahn verwendet werden.

3.2 Zellkultur

Zur Etablierung des Perfusions-Systems wurde eine humane Glioblastom-Zelllinie verwendet und metabolisch bei unterschiedlichen Rahmenbedingungen untersucht. Außerdem wurden humane neurale Vorläuferzellen im Rahmen der Untersuchung einer neuen Behandlungsmethode der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) verwendet. Im Folgenden werden die Kultivierung der Zelllinien, die Markierung des Mediums zur Untersuchung der NMR-sichtbaren mobilen Proteine sowie die Überprüfung der Zellvitalität beschrieben.

3.2.1 Humane Glioblastom-Zelllinie HTZ-349

Zur metabolischen Untersuchung unter verschiedenen Bedingungen wie Normoxie, Hypoxie und pH-Stress wurde die primäre humane Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 (WHO Grad IV) verwendet [Arslan et al. 2007; Bogdahn et al. 1989]. Die Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Neuroonkologie des Lehrstuhls für Neurologie am Universitätsklinikums Regensburg kultiviert. Dazu werden bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen zunächst aufgetaut, in einem Waschschrift von Dimethylsulfoxid (DMSO) befreit und in Zellkulturflaschen (T75, *Biochrom GmbH*, Deutschland) ausgesät. Das Medium, welches zur Kultivierung verwendet wird, besteht aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Deutschland), 1 % Penicillin / Streptomycin (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Deutschland), 1 % Eagle's Minimal Essential Medium Vitamins Solution (MEM Vitamins Solution; *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Deutschland), 1 % nicht essentielle Aminosäuren (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Deutschland), 1 % 200 mM L-Glutamin (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Deutschland) und 10 % fötales Kälberserum (FCS; *Biochrom GmbH*, Deutschland).

Von diesem Medium werden jeweils 10 ml zusammen mit etwa 500.000 Zellen in eine Zellkulturflasche gegeben. Für die NMR-Messungen wurden 5 bis 10 Millionen Zellen verwendet. Im Laufe der Arbeit wurden jedoch 6 Millionen Zellen als optimale Zellzahl in der Perfusionskammer bestimmt. Für diese Anzahl an Zellen werden 3 Zellkulturflaschen angesetzt und eine Woche lang bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach dieser Zeit sind dann etwa 2 Millionen Zellen in jeder Zellkulturflasche enthalten und damit insgesamt die benötigten 6 Millionen Zellen erreicht. Das adhärente Wachstum der Zellen wird dabei während dieser Woche kontrolliert und je nach Wachstum der Zellen wird gegebenenfalls das Medium gewechselt.

Nachdem die gewünschte Zellzahl erreicht ist, wird das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen mit Trypsin (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Deutschland) abgelöst. Die Anzahl an lebenden Zellen wird mittels einer Neubauer-Zählkammer unter Zugabe von Trypanblau (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Deutschland) bestimmt. Die Suspension wird dann zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 1 ml Medium ohne FCS aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt. So gelagert konnten die Zellen in das NMR-Labor zur Durchführung der Perfusionsexperimente transportiert werden.

3.2.2 ¹⁵N-Markierung der Glioblastom-Zelllinie HTZ-349

Für eine genauere Analyse der NMR-sichtbaren mobilen Proteine der Zelllinie HTZ-349 wurde ein ¹⁵N-markiertes Medium verwendet. Durch die im Medium enthaltenen markierten Aminosäuren sollte versucht werden, eine proteinspezifische Aminosäuresequenz der NMR-sichtbaren mobilen Proteine zu ermitteln. Zur Herstellung des isotope markierten Mediums wurde eine Menge von 3 mg/ml ISOGRO-¹⁵N Powder-Growth Medium (*Sigma-Aldrich Chemie*

GmbH, Deutschland) für eine gute Signalausbeute ermittelt, welche in dem für die Kultivierung üblichen Medium mit FCS gelöst und anschließend steril gefiltert wurde. Die Isotopenreinheit des zugesetzten Pulvers beträgt 98% und es enthält die Aminosäuren Alanin, Arginin, Aspartat, Glutamat, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin und Valin (Abbildung 3.5). Die Kultivierung wurde wieder von der Arbeitsgruppe Neuroonkologie am Lehrstuhl für Neurologie des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt. Eine Zellpassage (also ca. 5 Tage) erwies sich dabei experimentell als optimal für eine hohe Signalausbeute. Nach dieser Zeit wurde das markierte Medium entfernt und die Zellen mit Trypsin abgelöst. Analog zu Messungen ohne Markierung wurde der Anteil an lebenden Zellen bestimmt und das Zellpellet in 1 ml Medium ohne FCS in ein 1,5 ml Eppendorf Tube gegeben und in das NMR-Labor überführt.

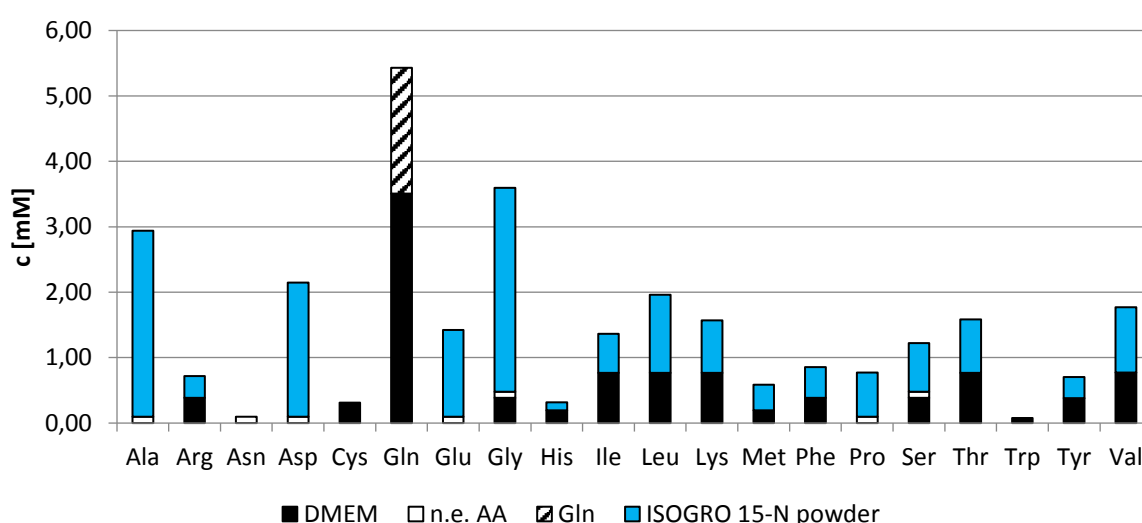


Abbildung 3.5 Zusammensetzung der Aminosäuren des ^{15}N -markierten Mediums. Das Medium besteht aus DMEM (schwarz), 1 % nicht essentieller Aminosäuren (weiß), 1 % 200 mM Gln (schraffiert), 1 % MEM Vitaminlösung, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % FCS. In diesem Medium wurden 3 mg/ml ISOGRO 15-N Pulver (blau) gelöst. Die jeweilige Verdünnung durch die Zusätze wurde berücksichtigt. Die genaue Zusammensetzung des FCS ist unbekannt. Ein möglicher Beitrag an Aminosäuren durch das FCS ist hier deswegen nicht berücksichtigt.

3.2.3 Humane neurale Stammzelllinie ReNCX

Nach der Etablierung des Perfusions-Systems wurden neurale Stammzellen der Zelllinie ReNCX (Merck Millipore, Deutschland) unter Behandlung eines Antisense Oligonukleotids untersucht. Die Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Neurodegeneration/ALS des Lehrstuhls für Neurologie am Universitätsklinikum Regensburg kultiviert. Dazu werden in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen in einem Wasserbad aufgetaut und in mit Laminin (Corning Inc., USA) beschichteten Zellkulturflaschen (T75, Sarstedt AG & Co, Deutschland) ausgesät. Das Kulturmedium besteht aus ReNcell Maintenance Medium (Merck Millipore, Deutschland), 1 % Penicillin / Streptomycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland), 1 % N2 Supplement (Life

Technologies, USA), 0,02 % Fibroblast Growth Factor basic Protein (FGF-b; *Merck Millipore*, Deutschland) und 0,02 % Epidermal Growth Factor Protein (EGF; *Merck Millipore*, Deutschland). Es werden je ca. 700.000 Zellen in eine Zellkulturflasche mit 12 ml Medium gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Nachdem die verwendete Zellzahl von 6 Millionen Zellen erreicht ist, werden die adhärenz gewachsenen Zellen mit Accutase (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Deutschland) abgelöst. Die Anzahl lebender Zellen wird durch Zugabe von Farbstoffen über Fluoreszenz bestimmt (Luna fl Dual Fluorescence Cell Counter, *Biozym Scientific GmbH*, Deutschland). Anschließend wurden die Zellen zusammen mit 1 ml Medium in ein 1,5 ml Eppendorf Tube für den Transport in das NMR-Labor überführt.

Für die Behandlung mit dem Antisense Oligonukleotid wurde nach Erreichen einer Zellzahl von ca. 6 Millionen Zellen das Medium aus der Zellkulturflasche durch frisches Medium mit 10 µM Antisense Oligonukleotid ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 96 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und dann nach zuvor beschriebener Prozedur abgelöst und in das NMR-Labor überführt.

3.2.4 Bestimmung der Zellvitalität

Zur Bestimmung des Anteils vitaler Zellen unmittelbar vor und nach einer Perfusionsmessung wird Trypanblau verwendet. Dazu werden 25 µl der Zellsuspension entnommen und zusammen mit 5 µl Trypanblau vermischt. Im Fall nach der Perfusionsmessung müssen die Zellen dazu erst mechanisch mittels einer Pipette vorsichtig aus dem Agarosegel befreit werden. Mittels eines Durchlichtmikroskops (*Axiostar*, *Carl Zeiss AG*, Deutschland) kann bei 40-facher Vergrößerung der Anteil an lebenden Zellen bestimmt werden, da das Trypanblau nur in Zellen mit beschädigter Membran eindringen kann. Deswegen erscheinen nur lebende Zellen ungefärbt, während Zellen mit einer beschädigten Membran eine Blaufärbung aufweisen. Für die Bestimmung des Anteils an lebenden Zellen werden zehn gleichmäßig über den Objektträger verteilte Bereiche untersucht. In jedem Bereich wird die Anzahl an lebenden und toten Zellen abgezählt. Daraus wird dann insgesamt der prozentuale Anteil an lebenden Zellen bestimmt.

3.3 Einbettung der Zellen in einen Faden aus Agarosegel

Zur Immobilisierung der Zellen im messsensiblen Bereich der Perfusionskammer werden die Zellen in einem Faden aus Agarosegel (Type IX-A, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Deutschland) eingebettet. Frühere Ergebnisse [Dobner 2011] zeigten, dass ein 0,5%iges Agarosegel keine

Einschränkung auf die Diffusion der Metaboliten ausübt und ein Faden mit dieser Gel-Konzentration noch die für eine Perfusion notwendige Stabilität aufweist.

Das verwendete Agarosegel hat einen Schmelzpunkt bei 62 °C und einen Gelpunkt bei unter 20 °C. Zur Herstellung wird das Agarosepulver in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS; *Sigma-Aldrich GmbH*, Deutschland) mit 50 µM 4,4-Dimethyl-4-Silapentan-Sulfon-Säure (DSS, NMR-Standard) und 1 % D₂O bei 80 °C vollständig gelöst. Das flüssige Gel wird steril gefiltert (0,2 µm) und anschließend zur Lagerung in ein steriles Eppendorf Tube überführt. Bis zur Verwendung wird das Gel unter den Gelpunkt gekühlt, wodurch kontrolliert werden kann, ob sich das Gel verfestigt.

Unmittelbar vor Verwendung wird das Gel durch erneutes Erhitzen auf 80 °C wieder in die flüssige Phase überführt. Anschließend wird es dann in einem Wasserbad auf 37 °C heruntergekühlt. Das Agarosegel liegt bei dieser Temperatur noch in flüssiger Phase vor. Nach der Überprüfung der Zellvitalität werden die Zellen dann für ca. 3 min bei 380 RZB zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand entfernt und die Zellen werden unter sterilen Bedingungen mit dem flüssigen Agarosegel vermischt. Dabei ist es besonders wichtig, dass beim Vermischen keine Luftblasen in das Gemisch eingearbeitet werden, da diese sonst später im Gelfaden eingebettet sind und die magnetische Homogenität der Probe zerstören. Als optimales Verhältnis wurden 6 Millionen Zellen in 300 µl Agarosegel ermittelt. Das Gemisch wird dann zügig mittels einer 5 ml Spritze in einen sterilen PTFE-Schlauch (*Reichert Chemietechnik GmbH + Co.*, Deutschland) aufgezogen damit das Agarosegel nicht abkühlt und dadurch viskoser wird. Der Schlauch hat einen Innendurchmesser von 0,7 mm und eine Länge von 1,2 m, dementsprechend wird die Abkühlung durch die große Oberfläche beschleunigt. Der PTFE-Schlauch wird zur Aushärtung für etwa 1 min in einem Eisbad gekühlt. Nach einer anschließenden Desinfizierung des Schlauchs mit 70%igem EtOH, kann der Gelfaden über die Spritze in die mit 1 ml Medium gefüllte Perfusionskammer gedrückt werden. Der Agarosefaden rollt sich durch die Injektion in die Perfusionskammer spiralförmig auf. Inklusive eingebetteter Zellen hat der Gelfaden eine Gesamtlänge von ca. 90 cm bei einer Oberfläche von ca. 20 cm². Trotzdem beträgt die gesamte Höhe des spiralförmig aufgerollten Fadens in der Perfusionskammer nur etwa 6 cm. Dadurch ist die Zelldichte im Messbereich ausreichend hoch und die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff auf Grund der großen Oberfläche des Fadens optimal. Die Zelldichte im Agarosefaden beträgt etwa 17.000 Zellen/mm³, was in etwa der Dichte von 2,5 Millionen Zellen in einer Zellkulturflasche entspricht, ausgehend vom Wachstum in einer Monoschicht. Damit entspricht die Zelldichte im Agarosefaden einer realen Dichte in der Zellkultur. Als letzter Schritt vor einer Perfusionsmessung wird die Perfusionskammer auf ein Gesamtvolumen von ca. 2 ml mit Medium aufgefüllt, damit beim Anschluss der Kammer an das Perfusions-System das Medium unter dem Niveau der Zuleitung bleibt. Dadurch wird ein Totvolumen im oberen Bereich der Perfusionskammer verhindert und somit das Kontaminationsrisiko minimiert.

3.4 Sterilität

Eine der größten Herausforderungen bei der Etablierung des Perfusions-Systems stellte die Sterilisation des gesamten Systems dar. Die Länge des gesamten Leitungssystems und eine geplante Messdauer von 72 Stunden oder länger waren dabei die Hauptfaktoren. Zudem wird ein nährstoffreiches Medium bei einer Temperatur von 37 °C in die Perfusionskammer gepumpt und das bei optimaler Sauerstoffversorgung und bei physiologischem pH. Es ist klar, dass dies nicht nur optimale Bedingungen für die zu untersuchenden Zellen darstellt, sondern natürlich auch das Wachstum vieler Mikroorganismen begünstigt.

3.4.1 Sterilisation des Perfusions-Systems

Auf Grund der Länge des Leitungssystems und der festen Montage der Edelstahl-Kapillarrohre und Sensoren waren Sterilisationsmethoden wie Autoklavieren, beziehungsweise Hitzesterilisation sowie Gassterilisation oder Sterilisation über Strahlung hier nicht anwendbar. Als geeignete Methode wurde daher die chemische Sterilisation durch eine Flüssigkeit gewählt. Als besonders effizientes flüssiges Sterilisationsmittel wird sowohl in der Lebensmittelindustrie als auch im medizinischen Sektor Peressigsäure verwendet. Peressigsäure wirkt oxidierend und liegt in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit Wasserstoffperoxid und Essigsäure vor. Die Vorteile der Peressigsäure sind die Anwendbarkeit bei relativ niedriger Temperatur und Konzentration, ein breites Wirkungsspektrum (bakterizid, sporizid, fungizid und viruzid), der Abbau zu umweltverträglichen Substanzen (Essigsäure, H₂O und O₂) und die hohe Materialverträglichkeit [Block 2001; Rutala & Weber 2004].

Daher wird 24 Stunden vor einer Perfusionsmessung das komplette System zusammengebaut und mit einer Sterilisationslösung, welche > 0,1 % Peressigsäure, Natriumpercarbonat und nichtionische Tenside enthält sterilisiert (Sekusept aktiv; *Ecolab Deutschland GmbH*, Deutschland). Dazu wird die Flüssigkeit mit 1 ml/min für eine Stunde durch das ganze System gepumpt, gemäß der angegebenen Einwirkzeit des Herstellers. Alle Vorbereitungen zur Sterilisation und zur Herstellung der Proben finden in einer Sterilbank statt. Start- und Auffangbehälter sind mit Schraubkappen mit Luftfiltern (0,2 µm) (*Bohlender GmbH*, Deutschland) verschlossen, so dass ein steriler Druckausgleich während des Pumpens stattfinden kann. Damit ist das Perfusions-System ein geschlossenes System, welches vollständig mit der Peressigsäure-Lösung sterilisiert werden kann. Außerdem wird eine zweite Perfusionskammer (nur NMR-Glasröhrchen ohne Zu- oder Ableitung) zusammen mit dem PTFE-Schlauch zur Herstellung des Agarosefadens, gegebenenfalls auch zusätzlich der Injektor, mit der Peressigsäure-Lösung befüllt und für eine Stunde sterilisiert. Nach dieser Zeit wird die Sterilisations-Lösung durch mehrfaches Spülen mit sterilem, destilliertem Wasser entfernt. Das Perfusions-System wird zunächst für eine Stunde mit einer Perfusionsrate von 1 ml/min gespült.

Da sich zeigte, dass durch den Einsatz der Peressigsäure-Lösung eine Schaumbildung im System auftritt, wurde das System dann zusätzlich über Nacht weiter mit sterilem Wasser gespült. Die Perfusionsrate wurde allerdings auf 100 µl/min abgesenkt, um den Verbrauch an sterilem Wasser zu senken. Insgesamt werden damit etwa 200 ml steriles Wasser zur Spülung des Systems verwendet.

Die Glasbehälter mit Schraubverschluss, welche als Start- und Auffanggefäß und für das sterile Wasser dienen, werden in einem Trockenofen bei trockener Hitze sterilisiert. Da die Wärmeleitung bei trockener Luft im Vergleich zu hoher Luftfeuchtigkeit, wie in einem Autoklav, vermindert ist, wurden die Temperatur und die Sterilisationszeit erhöht. Die Glasbehälter werden mit Alufolie verschlossen und für ca. 3 Stunden bei 160 °C sterilisiert [Darmady et al. 1961; Block 2001]. Nach einer langsamen, ca. 2 stündigen Abkühlungsphase werden die Behälter dann bis zur Verwendung steril gelagert.

3.4.2 Sterilität der Probe

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen am Lehrstuhl für Neurologie des Universitätsklinikums Regensburg ausgesät, kultiviert und schließlich in ein Eppendorf Tube überführt. Anschließend wurden die Zellen dann in das NMR-Labor transportiert. Dort wurden alle weiteren Arbeiten in einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Zusätze für das Medium, wie D₂O oder der Standard DSS, werden wie auch das Agarosegel durch Filtern (0,2 µm) sterilisiert. Die Perfusionskammer, der PTFE-Schlauch, welcher zur Herstellung des Gelfadens verwendet wird und der Injektor werden, wie zuvor erwähnt, mit Peressigsäure sterilisiert. Damit ist die Sterilität der Proben vor der Messung gewährleistet.

Im Rahmen der Vorbereitung der Perfusionsmessung muss das geschlossene sterile System zum Anschluss der Perfusionskammer und Einführung in das Spektrometer kurzzeitig geöffnet werden. Dadurch ist die Sterilität des Systems potenziell gefährdet. Deshalb werden dem Medium zusätzlich Antibiotika und Antimykotika zugesetzt. Im Falle der Zelllinie HTZ-349 sind es ca. 1 % Penicillin und Streptomycin (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Deutschland) und ca. 3 % Amphotericin B (250 µg/ml) (Fungizone; *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Deutschland).

Bei der Zelllinie ReNCX werden nur ca. 1 % Penicillin und Streptomycin verwendet, da diese Zelllinie sensibler auf Veränderungen im Medium reagieren wie die HTZ-349. Da zudem die Prozesse zur Etablierung der Sterilität bei der Verwendung der ReNCX Zellen bereits optimiert waren, wurde auf ein zusätzliches Antimykotikum verzichtet.

Die Sterilität des Mediums ist durch diese Zusätze, wegen der Begasung über einen gasdurchlässigen Silikon-Schlauch und der Luftfilter-Aufsätzen auf dem Start- und Auffangbehälter während einer Perfusionsmessung gewährleistet.

3.5 System- und Probenvorbereitung für eine Perfusionsmessung

Am Tag vor einer Perfusionsmessung wird das Perfusions-System zusammengebaut. Dazu werden die benötigten Dreiwegehähne eingebaut und die Perfusionskammer angeschlossen. Außerdem werden, wie in [Kapitel 3.4](#) beschrieben, alle Behälter, Schläuche und das gesamte Perfusions-System sterilisiert. Zudem wird das zur Einbettung benötigte Agarosegel hergestellt und steril gefiltert. Das Perfusions-System wird dann mit sterilem, destilliertem Wasser über Nacht gespült.

Unmittelbar vor der Perfusionsmessung wird das Medium frisch angesetzt. Für die Zellen der Zelllinie HTZ-349 besteht es, wie bei der Zellkultur, aus 500 ml DMEM mit jeweils 1 % Penicillin und Streptomycin, MEM Vitaminlösung, nicht essentielle Aminosäuren und L-Glutamin (200 mM). Hier wird allerdings auf die Zugabe von Serum (FCS) verzichtet, da das Serum zu einer sehr starken Schaumbildung neigt. Dadurch würde im schlimmsten Fall sowohl die optische Sauerstoffmessung als auch die magnetische Homogenität der Probe beeinträchtigt werden. Zusätzlich enthält das Perfusionsmedium dann noch 3 % Amphotericin B in einer Konzentration von 250 µg/ml, 1% steriles D₂O und 50 µM steriles DSS. Letztere zwei sind für das Lock-System des Spektrometers und zum Referenzieren der Spektren notwendig.

Im Perfusionsmedium sind, unter Berücksichtigung der Verdünnung durch die Zusätze, 3,4 g/L Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) enthalten, welches als pH-Puffer dient. Der pH-Wert kann bei diesem Kohlensäure-Bicarbonat-Puffersystem dann durch die entsprechende Begasung mit CO₂ auf den gewünschten Wert eingestellt werden. Für einen physiologischen Wert von 7,4 pH war für das Medium ohne Zellen, bei einer Perfusionsrate von 100 µl/min, eine Begasung mit 8,7 % CO₂ erforderlich. Bei Perfusionsmessungen mit den HTZ-349 war ein niedrigerer CO₂-Gehalt (5,0 - 8,0 %) notwendig, da die Zellen das Medium durch die Ausschüttung von Metaboliten wie Laktat in den sauren-pH Bereich verschoben haben. Der pH-Wert musste auf Grund von metabolischen Veränderungen während einer mehrtägigen Perfusionsmessung teilweise manuell über die CO₂-Begasung nachgeregelt werden.

Für die Zellen der Zelllinie ReNCX besteht das für eine Perfusionsmessung verwendete Medium, analog zur Zellkultur, aus 500 ml ReNcell Maintenance Medium, 1 % Penicillin und Streptomycin, 1 % N2 Supplement und je 0,02 % FGF-b und EGF. Zusätzlich werden dann noch 5 % steriles D₂O und 50 µM steriles DSS zugegeben.

Das Medium wird dann bei geringer Perfusionsrate (57 - 100 µl/min) durch das System gepumpt, bis die am Inkubator eingestellten Werte für Temperatur, Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt erreicht sind. Anschließend wird die Perfusionsrate für 30 min auf 1 ml/min erhöht, wodurch das Medium im gesamten Perfusions-System den gewünschten Sauerstoffgehalt und pH-Wert annimmt.

Die Zellen werden vom Lehrstuhl für Neurologie des Universitätsklinikums Regensburg abgeholt und es wird ein Zellvitalitätstest durchgeführt. Daraufhin werden die Zellen in das Agarosegel eingebettet, ein Faden geformt und in eine weitere, zuvor sterilisierte Perfusionskammer gegeben. Die Perfusion wird gestoppt und die Dreiwegehähne

verschlossen, damit die Perfusionskammern ausgetauscht werden können. Die angeschlossene Perfusionskammer wird zusammen mit der Zu- und Ableitung an den Dreiwegehähnen 3WH_3 und 3WH_4 vom Rest des Systems abgekoppelt und in das Spektrometer eingeführt. Anschließend werden die Zu- und Ableitung wieder mit dem System verbunden, die Dreiwegehähne wieder geöffnet und die Perfusion mit 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ gestartet. Nach Einstellung der Pulsprogramme am 800 MHz-Spektrometer werden die Aufnahme der Spektren und die Aufzeichnungen der Sauerstoff- und Temperaturwerte der beiden Sensorpaare zeitgleich gestartet.

3.6 Kontinuierliche pH-Messung

Für eine optimale Versorgung der Zellen während einer Messung ist unter anderem ein physiologischer Wert von 7,4 pH im Medium notwendig. Damit gewährleistet ist, dass dieser pH-Wert auch in der Perfusionskammer vorliegt, sollte eine Methode gefunden werden, die es ermöglicht eine permanente pH-Messung in der Kammer durchzuführen. Das hauptsächliche Problem war dabei der geringe Innendurchmesser der Perfusionskammer. Durch den Ableitungsschlauch wurde der vorhandene Platz in der Kammer weiter reduziert, wodurch der Einsatz eines Sensors nicht möglich war.

Die verbleibende Möglichkeit zur Überwachung des pH-Wertes ist die Verwendung von pH-sensitiven Substanzen. Diese zeigen bei einer Veränderung des pH-Wertes unterschiedliche chemische Verschiebungen im 1D ^1H -NMR-Spektrum [Tynkkynen et al. 2009]. Histidin war auf Grund seiner großen Sensitivität nahe dem physiologischen Bereich mit den Resonanzen der Protonen $\text{H}^{\delta 2}$ und $\text{H}^{\epsilon 1}$ des Imidazol-Rings die Substanz der Wahl. Dieselben Histidin-Resonanzen wurden auch bereits *in vivo* zur Bestimmung des pH-Wertes im humanen Gehirn verwendet [Vermathen et al. 2000]. Die Histidin-Resonanzen liegen mit 7,05 ppm ($\text{H}^{\delta 2}$) und 7,76 ppm ($\text{H}^{\epsilon 1}$) bei 7,4 pH gut sichtbar und nicht überlagert im 1D ^1H -NMR-Spektrum des Mediums vor.

Es wurden 1D-Spektren des für die HTZ-349 üblichen Mediums bei 18 unterschiedlichem pH-Werten (4,85 - 8,50 pH) aufgenommen und die daraus resultierenden chemischen Verschiebungen ermittelt. Durch den Fit des Kurvenverlaufs mit der Henderson-Hasselbalch Gleichung (Gleichung 2.21) wurden die Parameter δ_{HA} , δ_{A} und pK_{S} gewonnen. Dabei ist pK_{S} der negative dekadische Logarithmus der Säurekonstanten K_{S} , δ_{HA} die chemische Verschiebung der protonierten Form und δ_{A} die chemische Verschiebung der deprotonierten Form. Durch die Bestimmung dieser Parameter konnte ohne zusätzliche Zugabe einer Substanz, oder Veränderung der Perfusionskammer der pH-Wert während einer Perfusionsmessung kontinuierlich durch die chemische Verschiebung der Histidin Resonanzen δ_{obs} überwacht und durch die CO_2 -Begasung am Inkubator gegebenenfalls korrigiert werden. Durch die verwendeten Pulsprogramme ergab sich ein mögliches minimales Messintervall von nur 10 min.

Die Fehler der Bestimmung des pH-Wertes ergeben sich aus den absoluten Fehlern der Fit-Parameter und einem abgeschätzten absoluten Fehler für das Ablesen der chemischen Verschiebung $\Delta\delta_{obs}$ von 0,005 ppm. Durch die lineare Fehlerfortpflanzung ergibt sich folgende Gleichung für den gesamten absoluten Fehler bei der Bestimmung des pH-Wertes:

$$\Delta pH = \Delta pK_S + \frac{1}{\ln(10)} \cdot \left[\frac{\Delta\delta_{HA} + \Delta\delta_{obs}}{\delta_{HA} - \delta_{obs}} + \frac{\Delta\delta_{obs} + \Delta\delta_A}{\delta_{obs} - \delta_A} \right] \quad (3.1)$$

3.7 Kontinuierliche Sauerstoffmessung

Zur Überwachung des Sauerstoffgehaltes im Perfusionsmedium wurden im Laufe der Arbeit zwei verschiedene Konzepte verwendet. Zuerst wurde versucht mittels eines Sensormoleküls über die T_1 -Relaxationszeit den Sauerstoffgehalt zu bestimmen. Obwohl die Methode an sich funktionierte zeigte sich aber bei ersten Messungen, dass das Molekül seine Sensitivität nach ca. 30 Stunden verlor. Da dieses Problem nicht vollständig behoben werden konnte wurde dieses Konzept verworfen. Stattdessen wurden, wie in [Kapitel 3.1.5](#) beschrieben, optische Sauerstoffsensoren verwendet, welche in die Zu- und Ableitung der Perfusionskammer integriert wurden.

3.7.1 Sensormolekül Hexamethyldisiloxan (HMDSO)

Bei dem ersten Konzept sollte, analog zur pH-Messung, ein Sensormolekül verwendet werden, welches eine deutliche Sensitivität gegenüber Sauerstoff aufweist. Eine solche Substanz ist Hexamethyldisiloxan (HMDSO; *Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Deutschland), dessen T_1 -Relaxationszeit stark von dem umgebenden Sauerstoffgehalt abhängt. Das Molekül wurde bereits erfolgreich *in vivo* in Ratten zur Bestimmung des Sauerstoffgehaltes im Muskel- und Tumorgewebe verwendet und hat eine Protonenresonanz bei 0,00 ppm. HMDSO ist ein symmetrisches sowie hydrophobes Molekül und lässt sich daher nicht mit wässrigen Lösungen mischen [Kodibagkar et al. 2008]. Deswegen muss das Sensormolekül unter Verwendung eines Emulgators wie HS 15 (Solutol; *Sigma Aldrich Chemie GmbH*, Deutschland) als Nano-Emulsion verwendet werden [Gulaka et al. 2011].

Die T_1 -Relaxationszeit wird durch einen Fit mit [Gleichung 2.5](#) für die unterschiedlichen Wartezeiten τ (siehe [Kapitel 3.8.3](#)) ermittelt. Durch die zusätzliche Verwendung des Auslenkwinkels α als Fitparameter wird die Genauigkeit der T_1 -Bestimmung erhöht, da geringfügige Abweichungen der Auslenkung der Magnetisierung möglich sind.

Nach Kodibagkar et al. [Kodibagkar et al. 2006] besteht bei einer festen Temperatur ein linearer Zusammenhang zwischen dem Inversen der Spin-Gitter Relaxationszeit T_1 (Relaxationsrate R_1) und dem Sauerstoffgehalt:

$$R_1[s^{-1}] = A' + B' \cdot pO_2 \quad (3.2)$$

A' und B' sind Konstanten und pO_2 ist der Sauerstoffpartialdruck. A' beschreibt dabei die anoxische Relaxationsrate, welche durch die Dipol-Dipol-Relaxation dominiert wird. Die Konstante B' beschreibt den Effekt der Relaxation durch den paramagnetischen Sauerstoff. Auf Grund dieses linearen Zusammenhangs von R_1 und pO_2 kann der Sauerstoffgehalt in der Perfusionskammer über die T_1 -Relaxationszeit bestimmen werden kann.

Dazu wurde eine Nano-Emulsion nach Gulaka et al. [Gulaka et al. 2011] und eigenen Testreihen im Verhältnis von 40 % v/v HMDSO und 20 % v/v HS 15 in destilliertem Wasser erstellt. Die Emulsion wurde zudem für insgesamt 20 min in einem Wasserbad bei 37 °C mit Ultraschall behandelt um eine weitere Minimierung der Partikelgröße zu erreichen. Dadurch wird sowohl die Dauer der Stabilität der Emulsion als auch die Sensitivität auf Grund der vergrößerten Oberfläche der HMDSO-Partikel verbessert.

Dem für die HTZ-349 üblichen Medium wurde die Emulsion zugegeben, so dass insgesamt 0,125 % HMDSO enthalten waren. Das Medium wurde dann, wie in [Abbildung 3.6](#) skizziert, im Inkubator über den Begasungsschlauch begast, wodurch eine Variation des Sauerstoffgehaltes im Medium erreicht werden konnte.

Der Sauerstoffgehalt im Medium konnte mittels eines optischen Sauerstoffsensors (VisiFerm DO Arc 325; *Hamilton Co.*, USA) überprüft werden. Der Sauerstoffsensor und die Zu- und Ableitungen, welche aus Viton bestanden, wurden mit der Kappe der Messkammer gasdicht verklebt. Die Messkammer hatte ein Gesamtvolumen von 50 ml. Das Medium wurde dann durch die Perfusionskammer in einen Auffangbehälter gepumpt. Die Begasung sowie die Überprüfung des Sauerstoffgehaltes und die Aufnahme der T_1 -gewichteten Spektren erfolgten bei 37 °C. Auf eine Temperaturisolierung des gesamten Systems konnte bei diesem Aufbau verzichtet werden, da eine Abkühlung des Mediums zu einer Erhöhung der Gaslöslichkeit führt. Da das System aber durch die Verwendung von kurzen Viton-Schläuchen weitestgehend gasdicht war, konnte sich der Gasgehalt des Mediums somit praktisch nicht verändern. Insgesamt wurden 9 verschiedene Sauerstoffkonzentrationen von 1,7 - 23,6 % O_2 verwendet, wobei die zusätzliche Begasung mit 8,5 % CO_2 einen physiologischen pH-Wert garantierte. Das Medium wurde mit einer mittleren Perfusionsrate von 1 ml/min durch das System gepumpt. Nachdem ein konstanter Sauerstoffwert erreicht war, wurde die Perfusionskammer vom System getrennt und in das Spektrometer gegeben. Nach der Aufnahme der T_1 -gewichteten Spektren konnten durch den linearen Zusammenhang der Relaxationsrate R_1 und dem Sauerstoffgehalt pO_2 die Parameter A' und B' bestimmt werden.

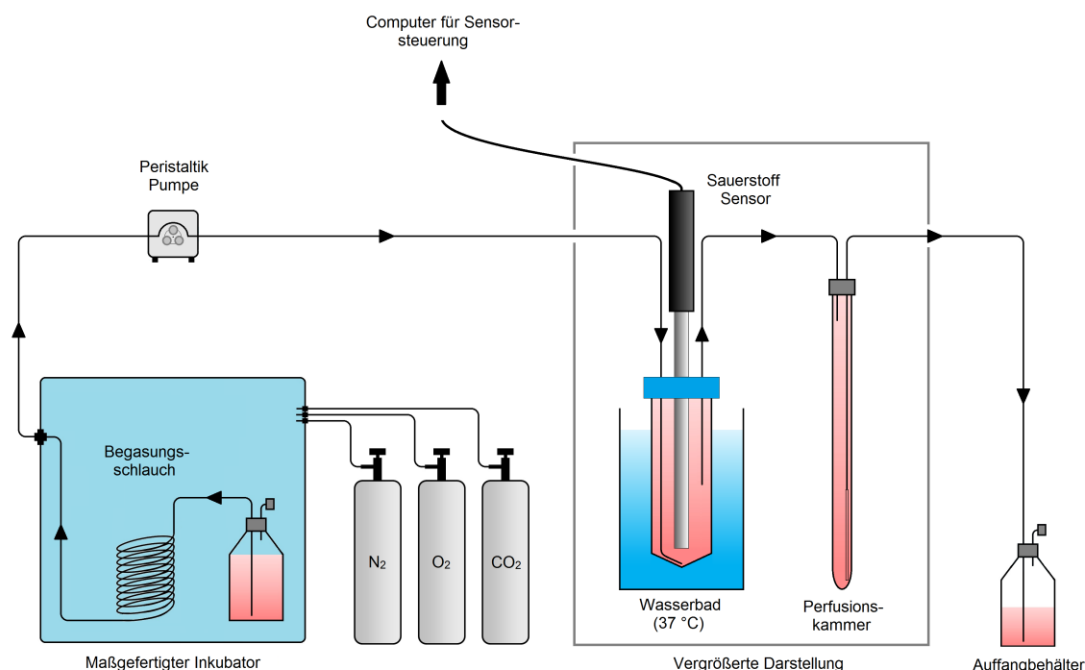


Abbildung 3.6 Schematischer Aufbau zur Bestimmung der Konstanten A' und B' über T_1 -gewichtete 1D ^1H -NMR-Spektren mit HMDSO im Medium. Das mit 0,125 % HMDSO versetzte Medium wird im Inkubator mit 9 unterschiedlichen Sauerstoffgehalten (1,7 - 23,6 % O_2) begast und in eine Messkammer gepumpt, welche in einem Wasserbad bei 37 °C gelagert ist. Der in der Kammer vorliegende Sauerstoffgehalt kann über einen optischen Sensor gemessen werden. Das Medium wird weiter über die Perfusionskammer in einen Auffangbehälter gepumpt. Nachdem am Sensor ein konstanter Sauerstoffgehalt erreicht ist kann die Perfusionskammer ausgebaut werden und die T_1 -Relaxationszeit durch ein entsprechendes T_1 -gewichtetes 1D ^1H -NMR-Spektrum bestimmt werden.

Da der lineare Zusammenhang auch bei niedrigen Sauerstoffgehalten gültig ist [Kodibagkar et al. 2006], die Auswertung mit den bestimmten Konstanten aber eine Abweichung der R_1 -Werte vom linearen Verhalten für niedrige Sauerstoffkonzentrationen ergab (siehe Kapitel 4.1.3.1), wurde eine Zwei-Punkte Messung durchgeführt. Dazu wurde eine luftgesättigte Probe (21 % O_2) und eine sauerstofffreie Probe (0 % O_2) hergestellt. Das Medium und die Emulsion wurden auf gleiche Weise wie bei der vorherigen Bestimmung der Konstanten hergestellt. Die Luftsättigung der Probe wurde durch kontinuierliche Begasung mit Luft für 15 min erreicht. Das Entfernen des Sauerstoffs in der zweiten Probe wurde durch Zugabe von 10 g/L Natriumsulfit (Na_2SO_3) bewirkt, welches den Sauerstoff chemisch bindet. Aufgrund des Überschusses an Natriumsulfit bei der zugegebenen Menge wird zusätzlich eindiffundierender Sauerstoff sofort gebunden. Zudem wurde der pH-Wert beider Proben auf 7,4 pH eingestellt. Außerdem wurde hier je ein 0,5%iger Agarosefaden erstellt, welcher insgesamt 0,02 % HMDSO enthielt, da sich bei Experimenten mit Zellen der Zelllinie HTZ-349 zeigte, dass HMDSO bei höheren Konzentration zytotoxisch wirken kann. Für beide Sauerstoffkonzentrationen wurde je ein Agarosefaden in 600 μl der entsprechenden Eichlösung gegeben. Es wurden

wieder T_1 -gewichtete Spektren der beiden Proben aufgenommen und die Parameter A' und B' bestimmt.

Der Fehler der Bestimmung der Konstanten A' und B' ergibt sich aus den absoluten Fehlern der einzelnen Parameter über die lineare Fehlerfortpflanzung:

$$\Delta pO_2 = \frac{\Delta R_1}{B'} + \frac{\Delta A'}{B'} + \frac{(R_1 - A') \cdot \Delta B'}{B'^2} \quad (3.3)$$

3.7.2 Optische Sauerstoffsensoren

Da die Sensitivität des HMDSO-Moleküls gegenüber Sauerstoff nicht konstant war, wurde als zweites Konzept zur kontinuierlichen Sauerstoffmessung die Verwendung von optischen Sensoren beschlossen ([Kapitel 3.1.5](#)). Diese Durchflusszellen wurden nach Herstellerangaben vor dem Einbau in das System geeicht. Dazu wurde analog zur Zwei-Punkte Messung mit dem HMDSO-Molekül eine luftgesättigte und eine sauerstofffreie Probe erstellt. Beide Sensoren wurden unter zusätzlicher Verwendung der Temperatursensoren jeweils gleichzeitig mit derselben Probe geeicht. Nach erfolgreicher Eichung der Sensoren wurden diese, wie in [Kapitel 3.1.6](#) beschrieben, in das Perfusionssystem eingebaut. Dort wurde die Eichung dann nochmals überprüft und angepasst.

Eine thermische Isolierung der Zuleitung wäre auf Grund der Länge des Leitungssystems technisch sehr aufwendig und kostspielig gewesen. Daher wurde eine Möglichkeit geschaffen die bei Raumtemperatur gemessenen Sauerstoffkonzentrationen auf den Gehalt bei 37 °C zurückzurechnen. Die Gaslöslichkeit in Flüssigkeiten ist allerdings sehr stark temperaturabhängig. Der Betrieb des Perfusions-Systems ohne Isolierung war deswegen möglich, da die Begasung im Inkubator und die Messung in der Perfusionskammer bei 37 °C stattfanden. Dazwischen kühlte das Medium auf Raumtemperatur ab, was allerdings zu einer Erhöhung der Gaslöslichkeit führte. Bei einer ausreichenden Gasdichtheit der Zuleitung, welche durch das Edelstahl-Kapillarrohr gegeben war, konnte sich die Gaszusammensetzung des Mediums während des Transports zur Perfusionskammer also nicht ändern.

Es wurden 6 unterschiedliche Sauerstoffgehalte von 0,0 - 21,0 % O₂ im Inkubator bei 37 °C eingestellt und das so begaste übliche Medium für die HTZ-349 mit 100 µl/min durch die Sensoren gepumpt. Bei 37,0 °C und einem Luftdruck von 1013 mbar beträgt die Sauerstofflöslichkeit in Wasser 6,73 mg/l. Daher entspricht dieser Begasungsbereich einer Stoffmenge des Sauerstoffs im Medium von 0,00 - 210,42 µmol/l. Bei der verwendeten Perfusionsrate wären dies dementsprechend 0,00 – 1,26 µmol/h Sauerstoff, welche durch das System gepumpt werden. Der wurde Sauerstoffgehalt an den Sensoren in 2 min Intervallen aufgezeichnet. Die mittleren gemessenen Sauerstoffwerte ergaben ein lineares Verhältnis zu den bei 37 °C eingestellten Sauerstoffkonzentrationen. Dieses Verhältnis konnte mit den [Gleichungen 3.4](#) und [3.5](#) für beide Sensoren gefittet werden.

$$O_2 S1(RT) = A + B \cdot O_2(37^\circ C) \quad (3.4)$$

$$O_2 S2(RT) = C + D \cdot O_2(37^\circ C) \quad (3.5)$$

Dabei ist $O_2 S1(RT)$ der bei Raumtemperatur gemessene Sauerstoffgehalt am Sensor in der Zuleitung zur Perfusionskammer und $O_2 S2(RT)$ der Sauerstoffwert am Sensor in der Ableitung der Perfusionskammer. $O_2(37^\circ C)$ ist der am Inkubator eingestellte Sauerstoffgehalt, mit dem das Medium bei $37^\circ C$ begast wurde.

Der bei Raumtemperatur gemessene Sauerstoffgehalt kann letztlich über die [Gleichungen 3.6](#) und [3.7](#) auf $37^\circ C$ zurückgerechnet werden.

$$O_2 S1(37^\circ C) = \frac{O_2 S1(RT) - A}{B} \quad (3.6)$$

$$O_2 S2(37^\circ C) = \frac{O_2 S2(RT) - C}{D} \quad (3.7)$$

Der Fehler des auf $37^\circ C$ zurückgerechneten Sauerstoffgehaltes ergibt sich aus der linearen Fehlerfortpflanzung ([Gleichung 3.8](#) und [3.9](#)). Dabei wurden als absolute Fehler für den Sauerstoffgehalt der Sensoren $\Delta O_2 S1(RT)$ und $\Delta O_2 S2(RT)$ sowie des Inkubators $\Delta O_2 Ink(37^\circ C)$ 0,4 % O_2 verwendet.

$$\Delta O_2 S1(37^\circ C) = \frac{\Delta A}{B} + \frac{|A - O_2 S1(RT)|}{B^2} \cdot \Delta B + \frac{\Delta O_2 S1(RT)}{B} + \Delta O_2 Ink(37^\circ C) \quad (3.8)$$

$$\Delta O_2 S2(37^\circ C) = \frac{\Delta C}{D} + \frac{|C - O_2 S2(RT)|}{D^2} \cdot \Delta D + \frac{\Delta O_2 S2(RT)}{D} + \Delta O_2 Ink(37^\circ C) \quad (3.9)$$

3.8 NMR-spektroskopische Messungen

Alle Perfusionsmessungen und die Messungen zur kontinuierlichen Messung des pH-Wertes und der Sauerstoffkonzentration wurden an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer (Avance Serie; *Bruker Biospin GmbH*, Deutschland) mit Cryo-Probenkopf (TCI) durchgeführt. Das Spektrometer verfügt über ein 32-Spulen Shimsystem und hat Gradientenspulen mit einer maximalen Gradientenstärke von $0,535 \pm 0,01$ T/m. Bei allen verwendeten und im Folgenden beschriebenen 1D Pulssequenzen wurden 32 k Datenpunkte bei einer spektralen Breite von 15 ppm aufgenommen. Dies resultierte in einer Akquisitionszeit von 1,36 s. Die aufgenommenen Spektren wurden mit Hilfe des Programms TopSpin 3.2 (*Bruker Biospin GmbH*, Deutschland) prozessiert und ausgewertet.

3.8.1 Perfusionsmessungen

Für die metabolische Untersuchung der Zellen wurde ein Block bestehend aus vier ^1H -Pulssequenzen verwendet, welcher kontinuierlich wiederholt wurde. Bei allen Pulssequenzen wurden jeweils 64 Einzelscans aufgenommen und die 90° -Pulslängen variierten zwischen 14,7 - 15,7 μs . Insgesamt betrug die Dauer eines Messblocks etwa 2 Stunden und die gesamte Messung erstreckte sich in der Regel über 72 Stunden.

Für die quantitative metabolische Auswertung wurde eine eindimensionale „Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy“ Pulssequenz (1D NOESY) mit Wasserunterdrückung verwendet (*Bruker* Nomenklatur: noesygppr1d). Die 1D NOESY-Sequenz ist im Bereich der Metabolomik die meistverwendete Sequenz und besteht insgesamt aus drei 90° -Pulsen. Normalerweise wird die NOESY-Pulssequenz als 2D Experiment verwendet um Kopplungen über den Kern-Overhauser-Effekt zu detektieren. Die Sequenz unterdrückt jedoch in der eindimensionalen Variante das Wassersignal durch den verwendeten Phasenzyklus und dem Effekt der Strahlungsdämpfung, bei dem die Magnetisierung der Wasserprotonen schneller in den Ausgangszustand relaxiert als die Magnetisierung der anderen Protonen [McKay 2011]. Zusätzlich findet bei der hier verwendeten Variante noch eine Wasserunterdrückung durch Sättigung bei einer Leistung von 45 dB über eine Dauer von 8 s statt. Die sinusförmigen „Homospoil“ Gradientenpulse, welche zur Dephasierung unerwünschter Quermagnetisierung verwendet wurden hatten eine Länge von 1 ms.

Eine weitere wasserunterdrückte 1D Pulssequenz, namens „Excitation Sculpting“, bestand aus einer mit einem wasserselektiven 180° -Puls modifizierten Spin-Echo Sequenz (*Bruker* Nomenklatur: zgesgp). Die Länge des angelegten selektiven Pulses betrug hier 2 ms und die Länge der Gradientenpulse betrug 1 ms. Diese Pulssequenz bietet im Vergleich zur 1D NOESY-Pulssequenz eine effektivere Wasserunterdrückung, wodurch das Signal zu Rausch Verhältnis erhöht wird. Allerdings ist der unterdrückte Bereich um das Wassersignal hier etwas größer, wodurch auch wassernahe Signale in ihrer Intensität abgeschwächt werden.

Zur genaueren Untersuchung der extrazellulären Metaboliten wurde eine T_2 -gewichtete Pulssequenz nach Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) verwendet (*Bruker* Nomenklatur: cpmg). Die Methode beruht auf dem Spin-Echo Verfahren, bei dem nach einem anfänglichen 90° -Puls und einer Wartezeit τ ein 180° -Puls folgt. Nach einer weiteren Zeit τ tritt dann auf Grund der Rephasierung der Spins ein Echo auf. Hier werden dann viele weitere 180° -Pulse im Abstand 2τ angelegt, wobei die aufgenommenen Echos mit der Zeit auf Grund von Spin-Spin Relaxation an Intensität verlieren. Die Einhüllende der Echointensitäten ergibt einen exponentiellen Abfall, dessen Zeitkonstante die T_2 -Relaxationszeit ist. Durch die inverse Proportionalität der T_2 -Relaxationszeit zur rotatorischen Korrelationszeit τ_c wird die Intensität der Echos von unbeweglicheren Molekülen schneller abgeschwächt. Dadurch ist es möglich mit der T_2 -Wichtung die extrazellulären, beweglicheren Metaboliten von den intrazellulären Metaboliten, welche in ihrer Bewegung eingeschränkt sind, zu unterscheiden. Bei hoher T_2 -Wichtung sind dementsprechend die Intensitäten der extrazellulären Metaboliten im Vergleich zu den intrazellulären Metaboliten erhöht. Bei den Perfusionsmessungen wurde eine CPMG-Echozeit von 300 ms bei einem zeitlichen Echoabstand (2τ) von 1 ms verwendet. Die verwendete Pulssequenz „cpmgesgp“ war zusätzlich mit einer Wasserunterdrückung der Methode „Excitation Sculpting“ kombiniert. Die Unterdrückung des Wassersignals erfolgte über einen selektiven 180° -Puls mit einer Länge von 2 ms und die Dauer der Gradientenpulse betrug 1 ms.

Als Gegenstück zur T_2 -Wichtung wurde eine Diffusionswichtung zur Untersuchung der intrazellulären Metaboliten verwendet. Bei der verwendeten Pulssequenz „diffu-oneshot“ [Pelta et al. 2002] wird die Magnetisierung nach einem anfänglichen 90° -Puls durch einen 180° -Puls und zwei asymmetrischen bipolaren Gradienten dephasiert. Nach einer Diffusionszeit Δ , während dieser die Magnetisierung wieder auf die z-Achse zurückgelenkt wird, findet eine Rephasierung durch einen zweiten 180° -Puls und asymmetrischen bipolaren Gradienten statt. Die Rephasierung gelingt dabei nur dann vollständig, wenn keine Diffusion der Spins entlang der z-Achse während der Diffusionszeit stattfindet. Dementsprechend werden frei bewegliche Metaboliten stärker in ihrer Intensität abgeschwächt als Metaboliten, die in ihrer Bewegung eingeschränkt sind. Folgerichtig werden intrazelluläre Metaboliten in ihrer Intensität weniger abgeschwächt als extrazelluläre Metaboliten. Bei dem hier verwendeten Perfusionsaufbau wird dieser Effekt durch die anliegende Perfusion zusätzlich verstärkt. Die verwendete Diffusionszeit Δ lag hier bei 100 ms bei einem rechteckförmigen Gradientenpuls δ von 2 ms. Der Asymmetrie-Faktor α betrug 0,2. Die Gradientenstärke wurde in 20 Schritten von 0,03 T/m auf maximal 0,535 T/m erhöht. Die Wasserunterdrückung erfolgte durch Sättigung bei einer Leistung von 55 dB über eine Dauer von 2 s. Die hier verwendeten sinusförmigen „Homospoil“ Gradientenpulse hatten eine Länge von 1,1 ms.

3.8.2 Kontinuierliche pH-Messung

Zur Bestimmung der chemischen Verschiebung der Histidin-Resonanzen wurde eine 1D ^1H wasserunterdrückte Pulssequenz nach der Methode „Excitation Sculpting“ verwendet. Es

wurden 24 Einzelscans pro Messpunkt aufgenommen und die 90° Pulslängen lagen zwischen 14,4 - 14,8 μ s. Die Gradientenpulse hatte eine Länge von 1 ms.

3.8.3 Kontinuierliche Sauerstoffmessung mit Hexamethyldisiloxan (HMDSO)

Zur Bestimmung des Sauerstoffgehaltes über das Molekül HMDSO wurde ein T_1 -gewichtetes 1D ^1H -Pulsprogramm nach der „Inversion Recovery“ Methode verwendet (*Bruker* Nomenklatur: *t1ir*). Dabei wird die Magnetisierung zuerst durch einen 180°-Puls ausgelenkt und nach einer Wartezeit τ dann durch einen 90°-Puls in die Detektionsebene gedreht. Die Wartezeit τ ist variabel, so dass der Verlauf der Relaxation der Magnetisierung in z-Richtung beobachtet werden kann. In Anlehnung an den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen [Kodibagkar et al. 2006; Gulaka et al. 2011] wurden 5 verschiedene Zeiten τ verwendet (0,8s, 3,2 s, 6,4 s, 12,8 s und 51,2 s) um die T_1 -Relaxation zu bestimmen. Es wurden pro Messpunkt 4 Einzelscans aufgenommen und die 90°-Pulslängen betrugen zwischen 16,0 - 16,3 μ s. Die Spektren wurden mit dem Programm TopSpin 3.2 prozessiert und die T_1 -Zeiten wurden durch einen Fit mit der Gleichung 2.5 mit dem Programm Origin 6.0 (*OriginLab Corporation, USA*) ermittelt.

3.8.4 Mobile Proteine

Für die Analyse der in ^{15}N -markierten Medium kultivierten Zellen der Zelllinie HTZ-349 wurden 2-dimensionale ^1H - ^{15}N -HSQC-Pulssequenzen (Hetero Single Quantum Coherence) mit einer Gradienten-Wasserunterdrückung (WATERGATE) [Sklénář et al. 1993] verwendet (*Bruker* Nomenklatur: *hsqc3gp19*). Bei einer HSQC-Sequenz wird die Sensitivität der ^{15}N -Kerne durch einen Polarisationstransfer von den Protonen über die skalare Kopplung erhöht (= Inensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer (INEPT)). Im HSQC-Spektrum sind nur Protonenresonanzen sichtbar, welche skalar mit den ^{15}N -Kernen koppeln. In der direkten Dimension wurden dabei 4k - 2k Datenpunkte aufgenommen, während in der indirekten Dimension 256 Datenpunkte aufgezeichnet wurden, wobei während der Datenakquisition eine ^{15}N -Entkopplung stattfand. Es wurden 16 Einzelscans pro HSQC aufgenommen und die 90°-Pulslänge für die Protonen betrug 15,2 μ s. Bei der Prozessierung der HSQC-Spektren mit dem Programm TopSpin 3.2 wurde ein Gauß-Filter mit negativer Linienverbreiterung in der Größenordnung der Linienbreite der sichtbaren Proteinresonanzen in den 1D Spektren verwendet. Die chemische Verschiebung der ^{15}N -Resonanzen wurde über die Verschiebung der Protonenresonanzen in 1D NOESY-Pulssequenzen über einen Skalierungsfaktor (0,101329118, [Wishart et al. 1995]) referenziert.

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse dieser Arbeit dargestellt, welche sich in drei Teile gliedern lassen. Der erste Teil befasst sich mit der Konstruktion des Perfusions-Systems und den Optimierungen, welche notwendig waren, um die Voraussetzungen für Messungen mit dem Perfusions-System durchzuführen. Des Weiteren wird auf metabolische Untersuchungen der Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 bei unterschiedlichen Rahmenbedingungen eingegangen. Im dritten Abschnitt werden dann humane neurale Stammzellen der Zelllinie ReNCX sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch nach Behandlung mit einem Antisense Oligonukleotid, welches zur Behandlung der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) eingesetzt werden soll, metabolisch analysiert. Zudem werden erste Ergebnisse zur Charakterisierung der mobilen Proteine gezeigt und neben einer genaueren Analyse des Glukose- und Glutamin-Stoffwechsels die Möglichkeit zur Überwachung der Zellvitalität über den Sauerstoffverbrauch der Zellen gezeigt.

4.1 Konstruktion des Perfusions-Systems

Im folgenden Abschnitt wird auf die Entwicklung des Perfusions-Systems eingegangen. Dabei werden die technischen Voraussetzungen beschrieben, welche für eine Perfusionsmessung mit Zellen notwendig waren. Außerdem wird erläutert, wie die kontinuierliche Messung von pH-Wert und Sauerstoffgehalt sowie die Zugabe eines Additivs über den Injektor realisiert wurden.

4.1.1 Technische Vorbereitungen

In der Konstruktionsphase des Perfusions-Systems ergaben sich eine Reihe von Schwierigkeiten, die gelöst werden mussten. Ein Problem war die Etablierung eines gasdichten Systems. In der ersten Version des Perfusions-Systems bestanden die Zu- und Ableitungen zur Perfusionskammer aus Viton-Schläuchen. Dies hatte prinzipiell den Vorteil, dass die

Perfusionskammer auf Grund der Flexibilität der Schläuche nicht vom Leitungssystem getrennt werden musste, um die Perfusionskammer im Spektrometer zu platzieren, wodurch die Sterilität des Systems weniger gefährdet war. Außerdem konnten Schlauchabschnitte bei Bedarf ohne großen Aufwand ersetzt werden.

Allerdings zeigte sich nach Eichung und Installation der Sauerstoffsensoren, dass die Viton-Schläuche trotz prinzipiell hoher Gasdichtheit, wegen der relativ großen Oberfläche von ca. 520 cm² im Vergleich zum Volumen von ungefähr 13 cm³ nicht dicht genug waren, um in der Perfusionskammer hypoxische Werte zu erreichen. Zudem benötigte das Medium bei einer Perfusionsrate von 100 µl/min etwa 3,7 Stunden um das gesamte Perfusions-System zu durchlaufen, wodurch sich trotz geringer Gaspermeabilität des Viton-Schlauches die Menge an Sauerstoff im Medium weiter akkumulierte.

Eine Verdopplung der Wandstärke des Viton-Schlauchs durch Ummantelung mit einem weiteren Viton-Schlauch, dessen Innendurchmesser exakt dem Außendurchmesser des kleineren Schlauchs entsprach, konnte die Gasdichtheit zwar deutlich verbessern, aber letztlich blieb die Gaspermeabilität des Systems zu groß. Bei einer Schlauchlänge von 3 m, einer Perfusionsrate von 100 µl/min und einer Begasung mit 10,0 % O₂ ergab sich in Fall des Viton-Schlauchs eine Abweichung von 2,6 % O₂ und im Fall des Viton-Schlauches mit vergrößerter Wandstärke eine Abweichung von 1,6 % O₂ vom Sollwert.

Als Ersatz wurden deswegen Edelstahl-Kapillarrohre verwendet, welche keine Gaspermeabilität aufwiesen. Die Kapillarrohre hatten zwar prinzipiell den Nachteil, dass die Zu- und Ableitungen kurzzeitig von der Perfusionskammer getrennt werden mussten, jedoch zeigte sich keine Beeinträchtigung der Sterilität durch diese Prozedur. An einigen wenigen Stellen, wie zum Beispiel der Übergang zu den Sensoren oder in der Perfusionskammer wurde noch Viton als Leitungsmaterial verwendet. Diese kurzen Abschnitte haben aber praktisch keine Auswirkung auf die Gasdichtheit. Bei Perfusionsmessungen konnten bei einer Begasung mit 0,0 % O₂ in diesem System stabile Sauerstoffwerte von bis zu $0,2 \pm 1,0$ % O₂ in der Perfusionskammer erreicht werden.

Eine weitere Schwierigkeit war die Etablierung und Aufrechterhaltung der Sterilität des gesamten Aufbaus, denn das verwendete Perfusionsmedium und die physiologischen Rahmenbedingungen bieten ideale Voraussetzungen für das Wachstum von Mikroorganismen. Das gesamte Perfusions-System und alle Zusätze mussten deswegen vor einer Perfusionsmessung sterilisiert werden.

Im Laufe der Arbeit wurden die Sterilisationsprozedur und die Vorbereitungen der Messungen mehrfach angepasst. In [Kapitel 3.4](#) wird das endgültige Verfahren zur Sterilisation beschrieben, dabei wurden dem Medium 1 % Penicillin und Streptomycin sowie 3 % Amphotericin B zugegeben. Die Zugabe von 1 % Penicillin und Streptomycin ist in der Zellkultur üblich. Die Verträglichkeit einer zusätzlichen hohen Dosierung des Antimykotikums musste an der Zelllinie HTZ-349 getestet werden und ergab mit 84 % lebenden Zellen nach 65 Stunden Inkubation keine Beeinträchtigung im Vergleich zu den Zellen im Medium ohne Amphotericin B (81 % lebende Zellen). Durch diese Zusätze und den in [Kapitel 3.4](#)

beschriebenen Maßnahmen konnte eine Kontamination des Mediums im System verhindert und die Sterilität aufrechterhalten werden.

Eine weitere Beeinflussung der Perfusionsmessungen wurde durch Gasblasen im Leitungssystem verursacht, welche in die Perfusionskammer gelangten und dort unter Umständen die magnetische Homogenität der Proben zerstörten. Vor allem aber wurde die Sauerstoffmessung dadurch erheblich beeinflusst.

Eine Quelle dieser Gasentwicklung war die Sterilisation mit der Peressigsäure-Lösung, denn durch den Abbau der Peressigsäure wurde Sauerstoff freigesetzt. Durch zugesetzte Tenside bildete sich Schaum im System, welcher auch nach der Spülung mit sterilem Wasser noch partiell im Leitungssystem vorhanden war. Durch eine Kombination aus einer einstündigen Spülung des Systems mit sterilem Wasser bei 1 ml/min Perfusionsrate und einer weiteren 18-stündigen Spülung bei 100 μ l/min konnte dieses Problem weitestgehend behoben werden.

Eine weitere Ursache waren die zu diesem Zeitpunkt konstruierten Sensor- und Injektions-Einheiten ([Abbildung 4.1](#) und [Abbildung 4.2](#)). Die verbauten Luer-Lock Kopplungen lösten sich nach einiger Zeit wieder und führten zu einer Undichtheit.

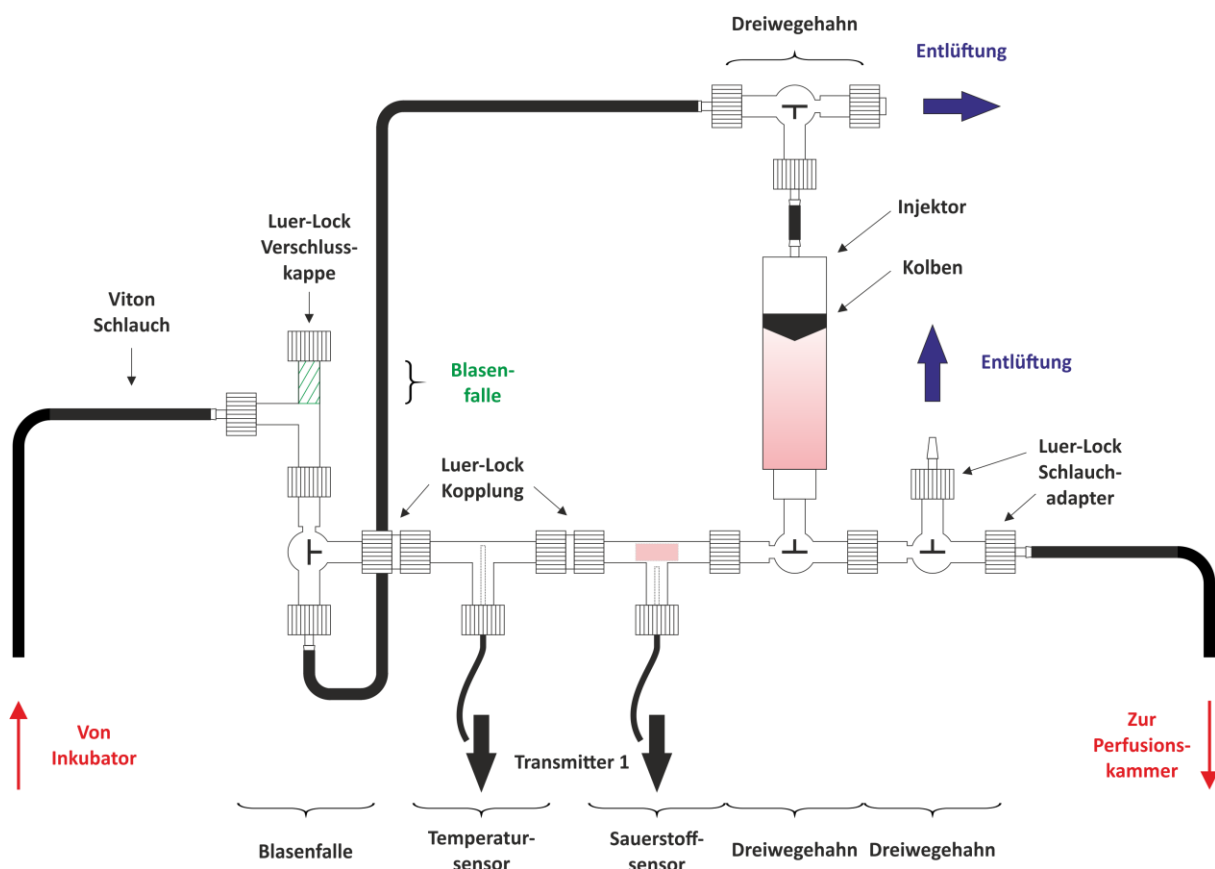


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der Vorgängerversion der Sensor- und Injektionseinheit im Zulauf zur Perfusionskammer. Die Zu- und Ableitung bestand ausschließlich aus Viton-Schläuchen. Eine Blasenfalle sollte eine störungsfreie Sauerstoffmessung ermöglichen. Der Temperatursensor war in das System integriert. Der Injektor wurde durch Umleitung des Mediums am unteren Ende der Blasenfalle betrieben.

Die Kopplungen waren notwendig um zwei weibliche Luer-Lock Anschlüsse miteinander zu verbinden, wie es bei den Sauerstoff- und Temperatur-Durchflusszellen der Fall war. In späteren Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass sich die Temperatur des Mediums am Ort der Temperatursensoren nicht von der Umgebungstemperatur unterschied. Somit konnten die Durchflusszellen der Temperatursensoren ausgebaut und damit auf einen Teil der Luer-Lock Konnektoren verzichtet werden. Außerdem zeigte sich, dass der Temperaturfühler wegen seinem direkten Kontakt zum Medium und der schweren Zugänglichkeit für das Sterilisationsmittel häufig für Kontaminationen verantwortlich war.

Auf Grund der Gasblasen im System wurde zudem eine Blasenfalle konstruiert ([Abbildung 4.1](#) und [Abbildung 4.2](#)), welche aus einer Durchflusszelle und einem Dreiwegehahn konstruiert wurde. Im oberen Teil der Blasenfalle befand sich ein mit Medium gefülltes Volumen, welches als Reservoir für einströmende Blasen diente. Dieses Volumen wurde allerdings nicht vom Medium durchflossen und trotz manueller Sterilisation des oberen Abschnitts mit Peressigsäure vor der Befüllung mit Medium, war auch die Blasenfalle häufig Auslöser einer Kontamination.

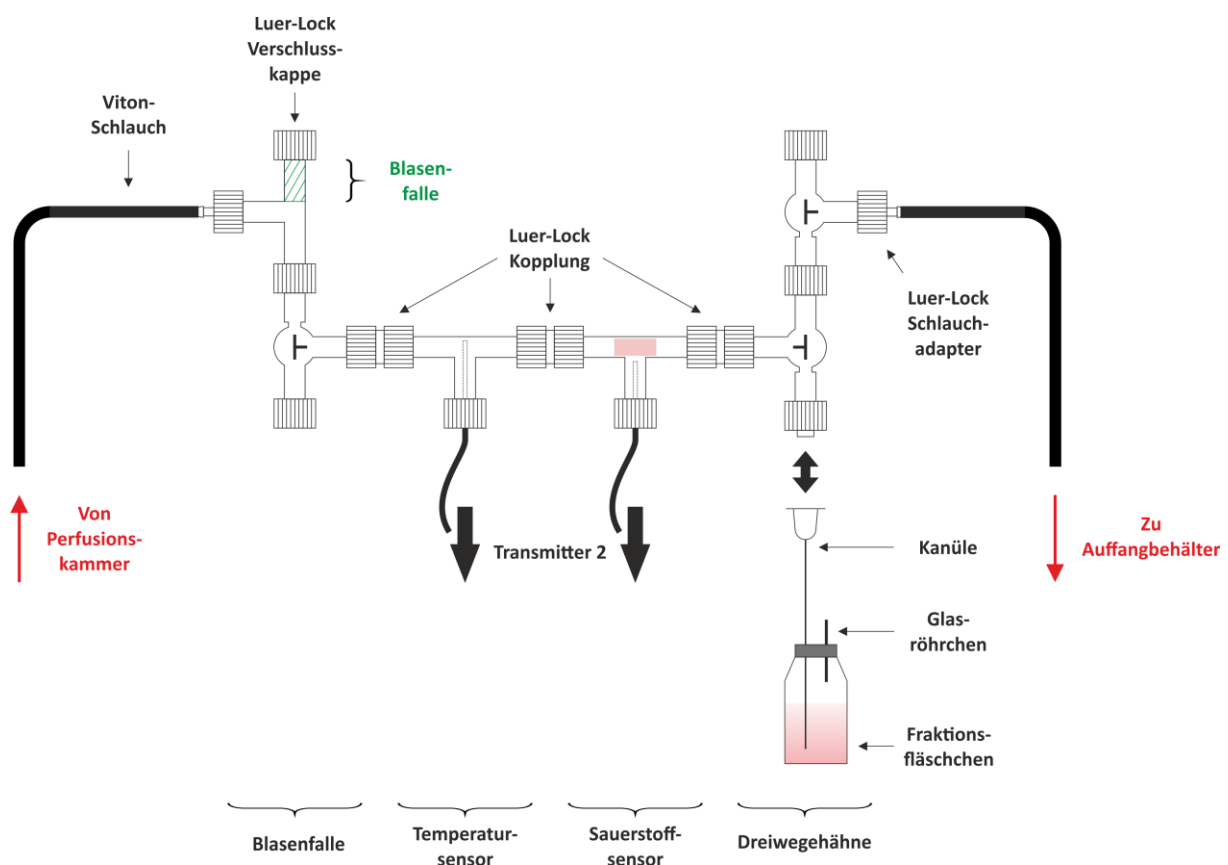


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der Sensoreinheit der Vorgängerversion im Ablauf der Perfusionskammer. Das Leitungssystem bestand ausschließlich aus Viton-Schläuchen. Nach der Perfusionskammer wurde eine weitere Blasenfalle installiert. Danach folgten Temperatur- und Sauerstoffsensor. Die folgenden zwei Dreiwegehähne konnten sowohl zur Absperrung des Mediums bei Installation der Perfusionskammer als auch zur Probenentnahme verwendet werden. Dazu wurde eine Kanüle über Luer-Lock Anschluss verbunden und dann konnten Proben in kleinen Fraktionsfläschchen abgefüllt werden. Das Glasröhrchen diente dabei zum Druckausgleich bei der Befüllung.

Eine andere Bauart der Blasenfalle, wie zum Beispiel ein Durchflussvolumen wäre denkbar gewesen, allerdings würde das zusätzliche Volumen einer derartigen Blasenfalle die Dauer bis zur Einstellung einer Hypoxie in der Perfusionskammer erheblich verlängern. Aus diesem Grund und da durch zuvor erwähnte Maßnahmen die Blasenbildung bereits erheblich reduziert werden konnte, wurden die Blasenfallen aus dem System entfernt. Damit konnte auch auf die restlichen Luer-Lock Konnektoren verzichtet werden. Dies reduzierte die Entstehung von Gasblasen zusätzlich, so dass die Perfusionsmessungen und vor allem die Sauerstoffmessung auch ohne Blasenfallen praktisch nicht mehr beeinflusst wurden.

Vor der Immobilisation der Zellen in der Perfusionskammer durch Einbettung in ein Agarosegel und der späteren Entfernung aus dem Gel musste eine potenzielle Beeinflussung der Zellvitalität ausgeschlossen werden. Durch Zellvitalitätstests vor und nach der Einbettung von Zellen in der für Perfusionsmessungen üblichen Zelldichte in einen Gelfaden und anschließendem mechanischen Herauslösen konnte gezeigt werden, dass sich der Anteil der lebenden Zellen nicht unterschied, d.h. die Zellvitalität wurde durch diese Prozeduren nicht beeinflusst.

Erste Perfusionsexperimente mit immobilisierten Zellen zeigten, dass sich die Position des Agarosefadens während einer Messung veränderte, oder dass der Faden sogar teilweise aus der Perfusionskammer gespült wurde. Ab einer Perfusionsrate von 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ wurde der Gelfaden komplett aus der Kammer gespült. Das technisch mögliche Minimum der Perfusionsrate lag bei 57 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die optimale Perfusionsrate, bei der eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet war und der Faden nicht zerstört wurde lag bei 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Positionsänderungen des Fadens traten hauptsächlich zu Beginn der Perfusionsmessung auf. Der Grund dafür waren Höhenunterschiede von Startbehälter, Perfusionskammer und Auffangbehälter. Durch das Anschließen der Perfusionskammer mit der Zellprobe und das Öffnen der Hähne ergab sich eine Dynamik im System, durch welche die Position des Fadens verändert wurde. Eine Optimierung der Schließ- und Öffnungsreihenfolge beim Anschluss der Perfusionskammer an das System und die Angleichung der Höhenunterschiede, vor allem von Auffangbehälter und Perfusionskammer, erbrachten eine deutliche Verbesserung der Lagestabilität des Fadens.

Bei der Etablierung der Injektionseinheit erwies sich eine manuelle Steuerung des Injektors als unzureichend. Dies lag hauptsächlich daran, dass der Agarosefaden, wie zuvor erwähnt, bereits ab einer Perfusionsrate von 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ aus der Perfusionskammer gespült werden konnte. Eine Zugabe des kompletten Injektionsvolumens hätte demnach mehr als 25 min gedauert. Eine gleichmäßige manuelle Injektion war deswegen unmöglich.

Eine Lösung für dieses Problem war ein automatischer Betrieb des Injektors. Der Injektor war allerdings direkt über dem Spektrometer platziert, um die Distanz zwischen der Injektionseinheit und der Perfusionskammer so kurz wie möglich zu halten. Dementsprechend lag in der Umgebung des Injektors ein starkes Magnetfeld an, welches einen direkten Einsatz von Steuereinheiten oder Pumpen am Ort der Injektionseinheit unmöglich machte. Um dieses Problem zu umgehen wurde eine zweite Viton-Zuleitung von der Peristaltik Pumpe aus dem

Inkubator zum Injektor gelegt. Damit sollte der Injektor über Luft aus dem Inkubator betrieben werden, was allerdings an der zu großen Kompressibilität der Luft scheiterte. Der Kolben im Injektor bewegte sich ruckartig nachdem die Luft in der oberen Kammer ausreichend stark komprimiert war, um die Haftreibung des Kolbens an der Wand des Injektors zu überwinden. Dadurch wurde der Agarosefaden in der Perfusionskammer zerstört und ausgespült.

Durch Verwendung eines weniger komprimierbaren Mediums wie Wasser und der Verringerung der Kontaktfläche des Kolbens mit der Wand des Inkubators konnte ein gleichmäßiger Betrieb des Injektors erreicht werden. In einem letzten Optimierungsschritt wurde auf das zweite Viton-Leitungssystem verzichtet und eine Möglichkeit geschaffen, den Injektor durch Umleitung in der Injektionseinheit direkt mit dem Perfusionsmedium zu betreiben ([Abbildung 4.1](#)).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele einzelne Optimierungsschritte notwendig waren, um als Resultat ein funktionierendes Perfusions- und Injektionssystem an einem NMR-Spektrometer zu etablieren. Zur Ermöglichung von hypoxischen Messungen wurden hauptsächlich Edelstahl-Kapillarrohre verbaut. Die Sterilität konnte durch entsprechende Vorsichtsmaßnahmen bei der Probenvorbereitung, durch Verwendung einer Peressigsäure-Lösung und Antibiotika sowie Antimykotika im Perfusionsmedium gewährleistet werden. Durch den externen Einsatz der Temperatursensoren, der Kopplung der Sauerstoffsensoren über Viton-Schlauchstücke und der Optimierung der Spülprozedur nach dem Einsatz der Peressigsäure konnte die Blasenbildung im Perfusions-System so weit reduziert werden, dass auf Blasenfallen verzichtet werden konnte. Die Optimierung der Anschlussprozedur der Perfusionskammer erhöhte die Lagestabilität des Agarosefadens in der Perfusionskammer. Ein automatischer Betrieb des Injektors durch das Perfusionsmedium ermöglichte schließlich eine erfolgreiche Injektion von Additiven in die Perfusionskammer.

4.1.2 Kontinuierliche Überwachung des pH-Wertes mittels Histidin-Resonanzen

Zur Messung des pH-Wertes in der Perfusionskammer wurde das im Medium enthaltene Histidin verwendet. Dieses zeigt bei 7,4 pH zwei gut sichtbare und nicht überlagerte Protonenresonanzen bei 7,05 ppm ($H^{\delta 2}$) und 7,76 ppm ($H^{\epsilon 1}$), welche bei einer Veränderung des pH-Wertes eine Variation der chemischen Verschiebung aufwiesen. Daher wurde zur Bestimmung der Parameter δ_A , δ_{HA} und pK_s die chemische Verschiebung der Histidin Signale für 18 verschiedene Proben des Perfusionsmediums bei unterschiedlichem pH-Wert (4,85 - 8,50 pH) über wasserunterdrückte 1D Spektren bestimmt ([Tabelle 4.1](#)).

Tabelle 4.1 Chemische Verschiebungen der ausgewählten Histidin Signale bei variierendem pH-Wert. Es wurden für 18 verschiedene pH-Werte die chemischen Verschiebungen von $H^{\delta 2}$ und $H^{\epsilon 1}$ bestimmt. Dafür wurde je ein wasserunterdrücktes 1D 1H -Spektrum nach der Methode „Excitation Sculpting“ bei 800 MHz Resonanzfrequenz und einer Temperatur von 37 °C aufgenommen. Für pH-Werte < 5,63 pH überlagerte die $H^{\delta 2}$ Resonanz mit Anteilen der Phenylalanin-Resonanz (Phe).

pH	$\delta_{\text{obs}} H^{\delta 2}$ [ppm]	$\delta_{\text{obs}} H^{\epsilon 1}$ [ppm]
4,85	Überlagerung mit Phe	8,562
5,09	Überlagerung mit Phe	8,543
5,63	7,285	8,379
6,29	7,156	8,041
6,74	7,089	7,867
6,90	7,074	7,828
7,00	7,072	7,825
7,11	7,062	7,800
7,18	7,058	7,789
7,33	7,051	7,771
7,43	7,047	7,764
7,52	7,041	7,751
7,61	7,040	7,749
7,70	7,038	7,744
7,80	7,035	7,740
7,91	7,033	7,737
8,03	7,030	7,733
8,50	7,011	7,718

Durch den Fit der so gewonnenen Daten mit Gleichung 2.21 konnten für beide Histidin-Resonanzen die Parameter δ_A , δ_{HA} und pK_S bestimmt werden (Tabelle 4.2), wodurch letztlich der pH-Wert durch die chemische Verschiebung δ_{obs} ermittelt werden konnte.

Die Titrationskurven zeigten ein sigmoidales Verhalten, welches bei $H^{\epsilon 1}$ stärker ausgeprägt war, da diese Resonanz sensitiver auf die pH-Änderungen reagierte und eine größere Variation der chemischen Verschiebung im untersuchten Bereich zeigte (Abbildung 4.3).

Tabelle 4.2 Aus dem Fit resultierende Parameter δ_A , δ_{HA} und pK_S mit den jeweiligen absoluten Fehlern für die Histidin-Resonanzen $H^{\delta 2}$ und $H^{\epsilon 1}$. Die Parameter ergaben sich aus dem in Abbildung 4.3 gezeigten Fit der Datenpunkte mit Gleichung 2.21. δ_A ist die chemische Verschiebung der deprotonierten Form, δ_{HA} die chemische Verschiebung der protonierten Form und pK_S der negative dekadische Logarithmus der Säurekonstanten.

Resonanz	δ_A [ppm]	$\Delta\delta_A$ [ppm]	δ_{HA} [ppm]	$\Delta\delta_{HA}$ [ppm]	pK_S	ΔpK_S
$H^{\delta 2}$	7,028	0,002	7,369	0,015	6,10	0,05
$H^{\epsilon 1}$	7,722	0,003	8,624	0,008	6,05	0,02

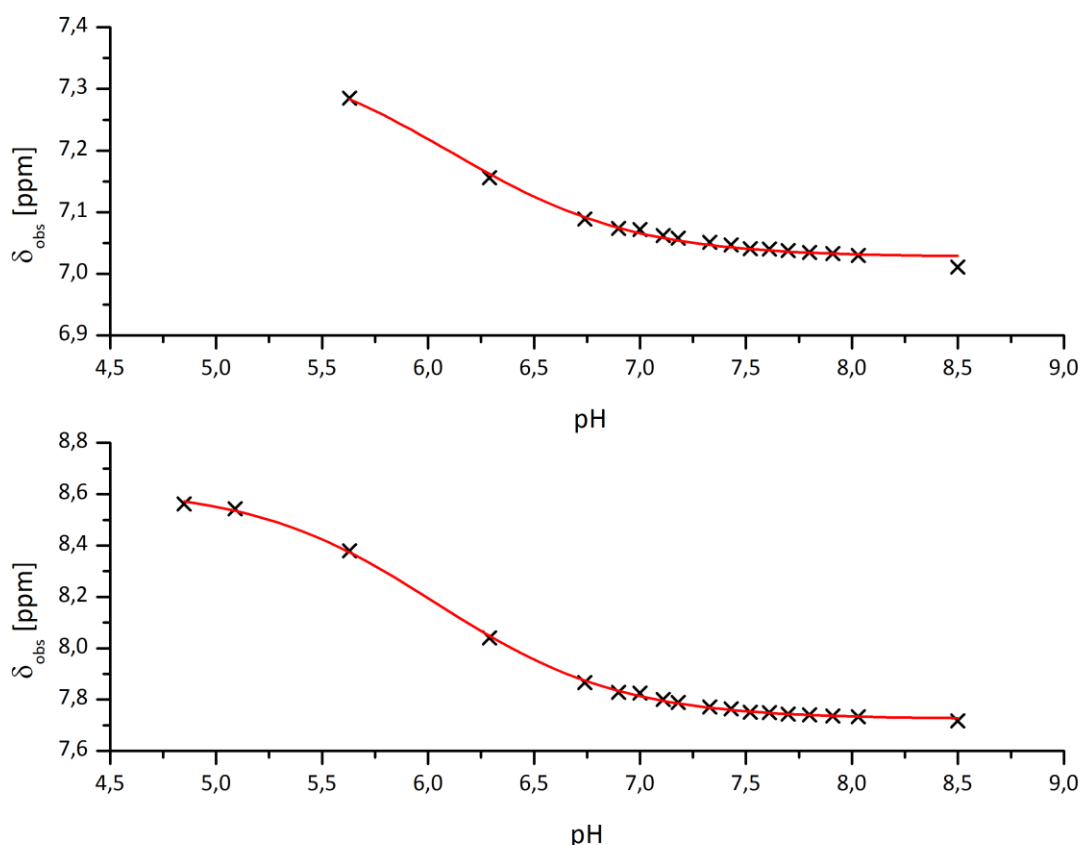


Abbildung 4.3 Fit der $H^{\delta 2}$ - und $H^{\epsilon 1}$ -Titrationsen mittels Henderson-Hasselbalch Gleichung. Die beobachtete chemische Verschiebung δ_{obs} der $H^{\delta 2}$ -Titration (oben) und der $H^{\epsilon 1}$ -Titration (unten) wurde gegen den eingestellten pH-Wert aufgetragen. Der Fit mit der Gleichung 2.21 (rote Kurve) ergab jeweils die für die spätere Bestimmung des pH-Wertes notwendigen Parameter δ_A , δ_{HA} und pK_s . Der Determinationskoeffizient R^2 des jeweiligen Fits lag in beiden Fällen über 0,99.

Durch die Begasung des Mediums mit CO_2 konnte der pH-Wert während einer Perfusionsmessung angepasst werden. Dies war vor allem bei den Tumorzellen notwendig, da in diesem Fall der pH-Wert des Mediums in der Perfusionskammer durch starke Laktatbildung in den sauren Bereich verschoben wurde. Je nach Zellzahl und Produktivität der Zellen musste die Begasung dementsprechend variiert werden.

In einer Versuchsreihe wurde ohne Verwendung von Zellen die mögliche Beeinflussung des pH-Wertes über die CO_2 Begasung im technisch möglichen Bereich von 0 – 20 % CO_2 überprüft. Dabei ergab sich als pH-Minimum bei 20 % CO_2 ein Wert von $7,1 \pm 0,1$ pH und als pH-Maximum bei 0 % CO_2 ein Wert von $8,1 \pm 0,4$ pH im Medium (Abbildung 4.4).

Der optimale Startwert für die CO_2 -Begasung ohne Zellen wurde über einen exponentiellen Fit aus dem Zusammenhang von CO_2 -Gehalt und pH-Wert bestimmt, da sich auf Grund des Puffersystems ein größerer Begasungsbereich für 7,4 pH ergab. Aus dem Fit ergab sich ein mittlerer Gehalt von 8,7 % CO_2 für einen physiologischen pH-Wert.

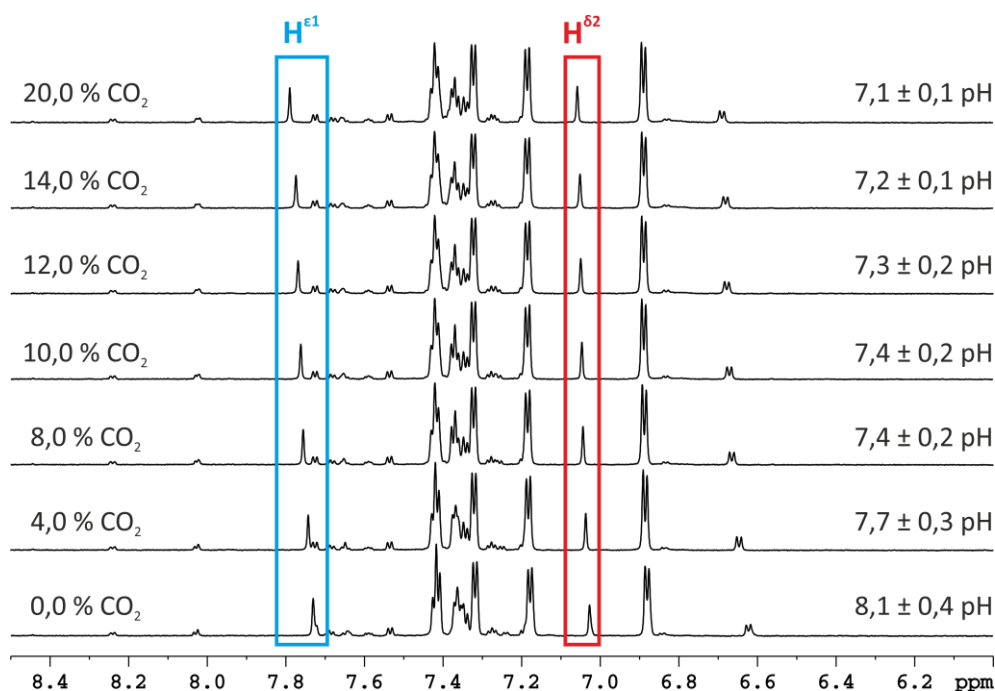


Abbildung 4.4 Veränderung der chemischen Verschiebung und damit des pH-Wertes der ausgewählten Histidin-Resonanzen bei einer Variation der CO₂-Begasung. Die Begasung wurde in 7 Schritten von 0,0 % auf 20,0 % CO₂ variiert. Das begaste Medium wurde mit 100 µl/min durch die Perfusionskammer gepumpt. Sowohl die Begasung als auch die Messung in der Kammer fanden bei 37 °C statt. Pro eingestelltem CO₂-Wert wurden vier 1D ¹H-NOESY-Spektren bei 800 MHz aufgenommen. Die pH-Werte wurden durch die Parameter δ_A , δ_{HA} und pK_S ermittelt, wobei die angegebenen pH-Werte die Mittelwerte der jeweils vier Experimente waren. Die Veränderung der chemischen Verschiebung bei Variation der CO₂-Begasung und damit des pH-Wertes waren sowohl bei H^{δ2} (rot) als auch H^{ε1} (blau) deutlich sichtbar. Die gezeigten Spektren wurden auf DSS bei 0,00 ppm geeicht.

4.1.3 Kontinuierliche Überwachung des Sauerstoffgehaltes

In den folgenden Unterkapiteln werden zwei unterschiedliche Konzepte beschrieben, mit denen in dieser Arbeit die Bestimmung und Überwachung des Sauerstoffgehaltes in der Perfusionskammer durchgeführt wurden.

4.1.3.1 Sauerstoffmessung mittels Sensormolekül HMDSO

Bei dem ursprünglichen Konzept zur Messung des Sauerstoffgehaltes in der Perfusionskammer wurde Hexamethyldisiloxan (HMDSO) als Sensormolekül verwendet. Das Funktionsprinzip war die Nutzung der starken Sensitivität der T₁-Relaxationszeit des HMDSO Moleküls gegenüber Veränderungen des umgebenden Sauerstoffgehaltes.

Dafür wurde eine Emulsion bestehend aus 40 % v/v HMDSO und 20 % v/v HS 15 in destilliertem Wasser dem für die HTZ-349 üblichem Medium zugegeben, so dass insgesamt ein Anteil von 0,125 % HMDSO im Medium enthalten war. Insgesamt wurden 9 verschiedene Sauerstoffgehalte über den Inkubator eingestellt und die jeweilige Relaxationsrate R_1 über einen Fit der T_1 -Relaxationszeit mit [Gleichung 2.5](#) ermittelt ([Tabelle 4.3](#)).

Tabelle 4.3 Änderung der T_1 -Relaxationszeit von HMDSO und damit der Relaxationsrate R_1 bei variierender Begasung des Mediums mit Sauerstoff. Die Begasung des Mediums mit einem HMDSO Anteil von 0,125 % fand bei 37 °C statt, der pH-Wert wurde auf 7,4 pH eingestellt. Das Medium wurde, wie im schematischen Aufbau in [Abbildung 3.6](#) gezeigt, mit 1 ml/min durch die Perfusionskammer gepumpt, welche bei 37 °C im Wasserbad gelagert wurde. Nach dem sich ein konstanter Sauerstoffgehalt eingestellt hatte, wurde die Perfusionskammer vom Aufbau getrennt und in das 800 MHz-Spektrometer eingebaut. Dort wurde dann bei ebenfalls 37 °C pro Sauerstoffwert ein T_1 -gewichtetes 1D ^1H -Spektrum aufgenommen. Die absoluten Fehler ergaben sich aus dem Fit der T_1 -Relaxationszeit bzw. aus dem relativen Fehler der R_1 -Rate.

O_2 [%]	T_1 [s]	ΔT_1 [s]	R_1 [s^{-1}]	ΔR_1 [s^{-1}]
1,7	5,19	1,21	0,1926	0,0449
2,7	4,76	0,91	0,2101	0,0404
5,8	5,18	0,01	0,1932	0,0005
9,1	4,56	0,02	0,2193	0,0008
12,4	4,22	0,01	0,2370	0,0007
15,0	3,90	0,02	0,2562	0,0014
18,1	3,65	0,02	0,2743	0,0014
21,4	3,38	0,04	0,2961	0,0032
23,6	3,22	0,02	0,3109	0,0024

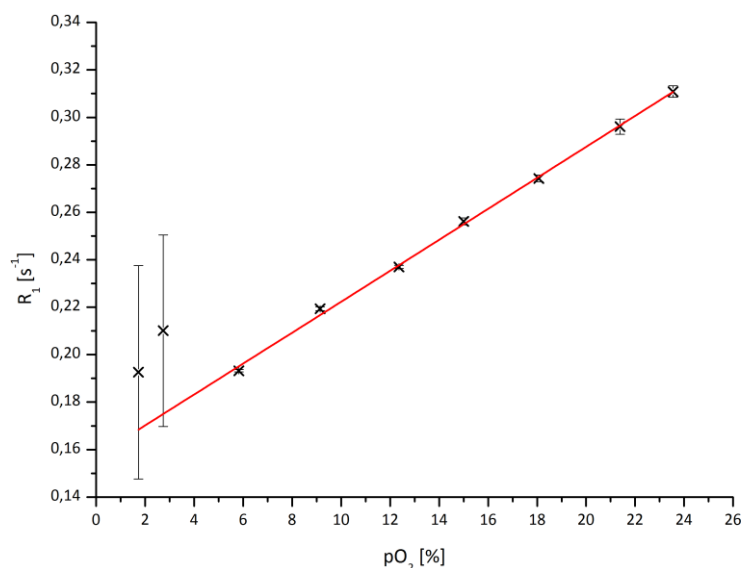


Abbildung 4.5 Linearer Fit der Relaxationsrate R_1 des HMDSO bei variierendem Sauerstoffgehalt $p\text{O}_2$. Es wurden die aus den T_1 -Messungen erhaltenen R_1 -Werte gegen den Sauerstoffgehalt der jeweiligen Probe aufgetragen und mit der [Gleichung 3.2](#) gefittet (rote Linie). Die Werte bei 1,7 und 2,7 % O_2 wurden beim Fit nicht berücksichtigt, da sie offensichtlich vom linearen Verlauf abwichen. Diese Abweichung bei niedrigen Sauerstoffgehalten war auf eine kleine Undichtheit des Messsystems und Diffusionsprozesse innerhalb der Messkammer zurückzuführen. Der Determinationskoeffizient R^2 war bei diesem Fit größer als 0,999.

Durch den linearen Zusammenhang von Relaxationsrate und Sauerstoffgehalt ([Gleichung 3.2](#)) wurden die Konstanten A' und B' bestimmt ([Tabelle 4.4](#)), über welche dann später der Sauerstoffgehalt einer Probe bestimmt werden konnte.

Tabelle 4.4 Fitergebnisse des linearen Zusammenhangs der Relaxationsrate R_1 des HMDSO und des Sauerstoffgehaltes pO_2 . Die hier ermittelten Konstanten und ihre absoluten Fehler ergaben sich aus dem Fit der Sauerstoffgehalte von 5,8 bis 23,6 % O_2 .

A'	$\Delta A'$	B'	$\Delta B'$
0,1571	0,0017	0,0065	0,0001

Bei sehr niedrigen Sauerstoffwerten zeigte sich eine deutliche Abweichung vom linearen Zusammenhang ([Abbildung 4.5](#)). Dies lag zum einen an dem großen Volumen des Messzylinders und der Diffusion von Sauerstoff aus dem Totvolumen in das Medium. Dadurch waren letztlich höhere Sauerstoffwerte in der Perfusionskammer vorhanden, als zuvor in der Messkammer durch den Sensor gemessen wurden. Zum anderen spielten bei so geringen Sauerstoffkonzentrationen auch kleine Undichtheiten im Versuchsaufbau eine größere Rolle.

Daher wurde entschieden, eine Zwei-Punkt Eichung mit sauerstofffreien und luftgesättigtem Medium (21 % O_2) durchzuführen (siehe [Kapitel 3.7.1](#)), denn der lineare Zusammenhang zwischen R_1 und O_2 war nach Kodibagkar et al. [Kodibagkar et al. 2006] auch bei geringen Sauerstoffkonzentrationen gültig. Für die sauerstofffreie Probe ergab sich eine mittlere T_1 -Relaxationszeit von $8,81 \pm 0,06$ s und für die luftgesättigte Probe ein Mittelwert von $3,43 \pm 0,03$ s für das HMDSO ([Tabelle 4.5](#)).

Tabelle 4.5 T_1 -Relaxationszeit und R_1 -Relaxationsrate des HMDSO der sauerstofffreien und luftgesättigten Probe der Zwei-Punkt Eichung. Die absoluten Fehler resultierten aus dem Fit der T_1 -Relaxationszeit bzw. dem relativen Fehler der R_1 -Rate. Die mittlere T_1 -Relaxationszeit für die sauerstofffreie Probe ergab sich aus 18 T_1 -gewichteten 1D 1H -Spektren über einen Zeitraum von 17 Stunden. Die mittlere T_1 -Zeit für die luftgesättigte Probe ergab sich aus 9 T_1 -gewichteten 1D 1H -Spektren über eine Gesamtzeit von 3 Stunden. Die Messungen wurden bei 800 MHz Resonanzfrequenz, einer Temperatur von 37 °C und einem physiologischen pH-Wert durchgeführt.

O_2 [%]	T_1 [s]	ΔT_1 [s]	R_1 [s^{-1}]	ΔR_1 [s^{-1}]
0,0	8,81	0,06	0,114	0,001
21,0	3,43	0,03	0,292	0,003

Daraus resultierten nach einem Fit mit [Gleichung 3.2](#) folgende Fitparameter:

Tabelle 4.6 Fitergebnisse des linearen Zusammenhangs der Relaxationsrate R_1 und des Sauerstoffgehaltes pO_2 des Mediums. Da dies eine Zwei-Punkt Eichung war, mussten die absoluten Fehler für $\Delta A'$ und $\Delta B'$ abgeschätzt werden.

A'	$\Delta A'$	B'	$\Delta B'$
0,1100	0,0100	0,0086	0,0001

Mit den aus dem Fit erhaltenen Parametern war es damit möglich über eine T_1 -Messung während einer Perfusionsmessung den Sauerstoffgehalt einer Probe zu bestimmen.

Nach Ermittlung der Konstanten zeigte sich bei den Perfusionsmessungen nach ungefähr 30 Stunden ein Verlust der Sensitivität des Sensormoleküls HMDSO gegenüber der im Medium vorhandenen Sauerstoffkonzentration. Dies äußerte sich in einem abrupten Anstieg der T_1 -Relaxationszeit, beziehungsweise einem schlagartigen Abfall des daraus bestimmten Sauerstoffgehaltes. Als Auslöser für dieses Phänomen wurde eine Fusion der Emulsionspartikel im Agarosefaden vermutet. Durch die Vereinigung zu größeren Partikeln nahm die Anzahl an oberflächennahen Molekülen insgesamt ab, wodurch die Sensitivität gegenüber dem umgebenden Sauerstoff reduziert wurde, da wahrscheinlich hauptsächlich Oberflächenmoleküle mit dem paramagnetischen Sauerstoff reagierten. Ein Zusammenschluss zu größeren Partikeln wäre durch die Perfusion und einer relativ großen Porendimension des Agarosegels (> 364 nm [Pernodet et al. 1997]) im Vergleich zur Partikelgröße der Emulsion (≥ 12 nm) begünstigt worden.

Bei den durchgeführten Experimenten waren keine Zellen enthalten und die Versuchsbedingungen wurden konstant gehalten. Deswegen konnte ein tatsächlicher Abfall des Sauerstoffgehaltes ausgeschlossen werden, da die einzige Möglichkeit der Verringerung des Sauerstoffgehaltes ein Verbrauch durch eine Kontamination gewesen wäre. Dies konnte allerdings bereits deswegen ausgeschlossen werden, weil die im Medium enthaltenen Metaboliten wie zum Beispiel Glukose nicht verbraucht worden waren. Außerdem hätte ein kontaminiertes Medium eine Trübung aufgewiesen und eine bakterielle Kontamination hätte auf Grund der produzierten sauren Stoffwechselprodukte sowie des im Medium enthaltenen pH-Indikators (Phenolrot) einen gelblichen Farbumschlag verursacht, was beides nicht der Fall war. Zudem zeigten die T_1 -Relaxationszeiten anderer im Medium enthaltener Substanzen wie zum Beispiel Pyruvat, Tyrosin oder Threonin keinen Anstieg, was bei einem vollständigen Verbrauch des paramagnetischen Sauerstoffs aber zu erwarten gewesen wäre.

Ohne Perfusion trat kein Verlust der Sauerstoff-Sensitivität des HMDSO auf und die Verwendung eines dichteren Agarosegels unter Perfusion vergrößerte die Dauer in der die Sensitivität des HMDSO-Moleküls gegenüber Sauerstoff konstant blieb. Beides sprach für die zuvor aufgestellte These über die Fusion der HMDSO-Partikel. Daher wurde versucht ein möglichst dichtes Agarosegel zu verwenden und zudem einen möglichst kleinen Durchmesser der HMDSO-Partikel zu erreichen. Dazu wurde zusätzlich eine Behandlung der Emulsion mit Ultraschall durchgeführt. Die damit erstellte Emulsion zeigte einen Anstieg der T_1 -Relaxationszeit um $0,79 \pm 0,01$ s, während die ursprüngliche Emulsion um $6,40 \pm 0,02$ s über eine gesamte Messdauer von ca. 66 Stunden zunahm. Letztlich führten zusätzliche Bemühungen aber zu keiner weiteren Verbesserung der Emulsionsstabilität ([Abbildung 4.6 A - D](#)).

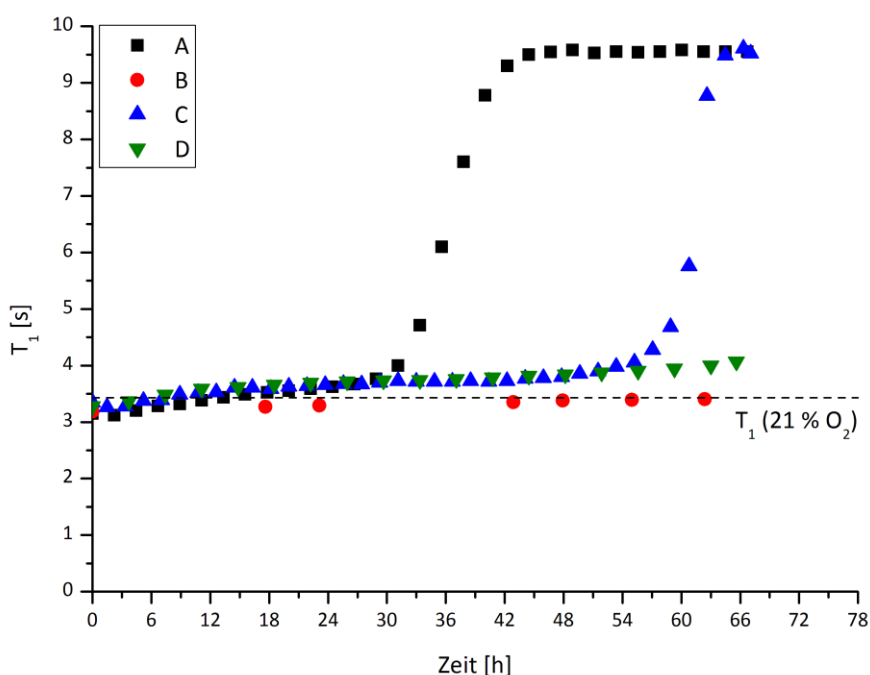


Abbildung 4.6 T₁-Verlauf bei unterschiedlicher Emulsionsstabilität. Der pH-Wert war bei allen Experimenten im physiologischen Bereich und alle Proben wurden mit 21 % O₂ begast. **A)** 0,5%iger Agarosefaden mit insgesamt 1,2 % HMDSO und 0,6 % HS 15 bei einer Perfusion mit 100 µl/min. Nach etwa 30 Stunden zeigte sich ein abrupter Anstieg der T₁-Relaxationszeit. **B)** 0,5%iger Agarosefaden mit insgesamt 1,2 % HMDSO und 0,6 % HS 15 ohne Perfusion. Die T₁-Zeit blieb über die gesamte Messdauer nahezu konstant bei T₁ (21 % O₂) = 3,43 s (gestrichelte Linie). **C)** 1,5%iger Agarosefaden mit insgesamt 1,2 % HMDSO und 0,6 % HS 15 bei einer Perfusion mit 100 µl/min. Nach etwa 55 h zeigte sich ein starker Anstieg der T₁-Relaxationszeit. **D)** 0,5 %iger Agarosefaden mit insgesamt 1,2 % HMDSO und 0,6 % HS 15 bei einer Perfusion mit 100 µl/min. Zusätzlich wurde die Emulsion vor der Einbettung in das Agarosegel für insgesamt 20 min mit Ultraschall behandelt. Es zeigte sich ein leichter Anstieg von 0,79 s der T₁-Zeit über die gesamte Messdauer. Alle Messungen fanden bei 37 °C und einem pH-Wert von 7,4 pH statt. Die Messungen unter Perfusion (A, C und D) fanden bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz statt, die Messung ohne Perfusion (B) wurde bei 500 MHz durchgeführt.

In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg wurde außerdem versucht ein dichteres Gel für die Einbettung des HMDSO zu erstellen. Dazu wurde ein quervernetztes Diels-Alder Gel erstellt, welches eine Porengröße von nur wenigen Nanometern aufwies, wodurch eine Fusion der HMDSO Partikel unterbunden werden sollte. Die Schwierigkeit war allerdings das Formen des Gels, da es erst über mehrere Stunden bei 37 °C aushärtete und es stark an der umgebenden Oberfläche haftete. Aus diesen Gründen konnte der Gelfaden nicht wie üblich mittels eines Teflon-Schlauches hergestellt werden. Anstatt eines Gelfadens wurde daher über eine Innenbeschichtung der Perfusionskammer als weitere Möglichkeit nachgedacht. Diese Methode wurde allerdings durch die lange Aushärtezeit des Gels erschwert und zudem hätte sich diese Beschichtung nur schwer wieder aus der Perfusionskammer entfernen lassen, was letztlich eine erfolgreiche Sterilisation unmöglich gemacht hätte. Daher wurde entschieden den Sauerstoffgehalt im System über Sensoren vor und nach der Perfusionskammer und nicht weiter mittels HMDSO in der Kammer zu bestimmen.

4.1.3.2 Sauerstoffmessung mittels optischer Sensoren

Für die kontinuierliche Messung des Sauerstoffgehaltes wurde je ein Sensor in der Zu- und Ableitung der Perfusionskammer eingebaut und geeicht. Es wurde das übliche Standardmedium für die Zelllinie HTZ-349 durch das Perfusions-System ohne Zellen mit 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ gepumpt und bei 6 unterschiedlichen Sauerstoffgehalten von 0,0 - 21,0 % O_2 im Inkubator begast. Wie in [Kapitel 3.7.2](#) beschrieben entspricht dies einer Stoffmenge an Sauerstoff von 0,00 – 210,42 $\mu\text{mol}/\text{l}$. Zudem wurde der pH-Wert des Mediums über die CO_2 -Begasung auf den physiologischen Wert von 7,4 pH eingestellt. Im Mittel wurden 3 Messungen pro Sauerstoffwert über durchschnittlich 11 Stunden in einem Messintervall von 2 min durchgeführt ([Tabelle 4.7](#)).

Tabelle 4.7 Eingestellter Sauerstoffgehalt bei 37 °C (O_2 (37°C)) und gemessener Sauerstoffgehalt an den Sensoren im Zulauf (O_2 S1) und Ablauf (O_2 S2) der Perfusionskammer bei Raumtemperatur. Die Sauerstoffsensoren wurden vor der Messung nach Herstellerangaben geeicht. Die Perfusionsrate betrug 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, der pH-Wert lag im Mittel bei 7,4 pH und das Messintervall der Sauerstoffsensoren betrug 2 min. Die Raumtemperatur betrug im Mittel $23,3 \pm 0,8$ °C.

O_2 (37 °C) [%]	O_2 S1 (RT) [%]	O_2 S2 (RT) [%]
0,0	0,4	0,4
5,0	4,3	5,1
10,0	8,3	9,5
15,0	11,9	13,8
20,0	15,8	17,9
21,0	16,6	-

Die mittleren konstanten Sauerstoffwerte bei Raumtemperatur ergaben ein lineares Verhältnis zum eingestellten Sauerstoffgehalt bei 37 °C. Da dieses Verhältnis für beide Sensoren unterschiedlich war, wurde für jeden Sensor ein Parametersatz aus dem Fit mit den [Gleichungen 3.4](#) und [3.5](#) zu den eingestellten Sauerstoffwerten bei 37 °C bestimmt ([Abbildung 4.7](#)).

Mit den damit erhaltenen Parametern A, B, C und D ([Tabelle 4.8](#)) war es dann möglich von den bei Raumtemperatur gemessenen Sauerstoffgehalten auf die Werte bei 37 °C durch die [Gleichungen 3.6](#) und [3.7](#) zurückzurechnen.

Die Bestimmung der Konstanten wurde bei einer mittleren Temperatur von $23,3 \pm 0,8$ °C durchgeführt. Dementsprechend würde die Bestimmung des Sauerstoffgehaltes bei 37 °C über die Konstanten streng genommen nur für diese Temperatur gelten. Allerdings konnte des Weiteren gezeigt werden, dass sich pro Änderung der Umgebungstemperatur von 1 °C der Sauerstoffgehalt nur um durchschnittlich 0,3 % O_2 änderte. Da das Perfusions-System in einer klimatisierten Umgebung stand, waren potenzielle Abweichungen durch Temperaturunterschiede somit vernachlässigbar.

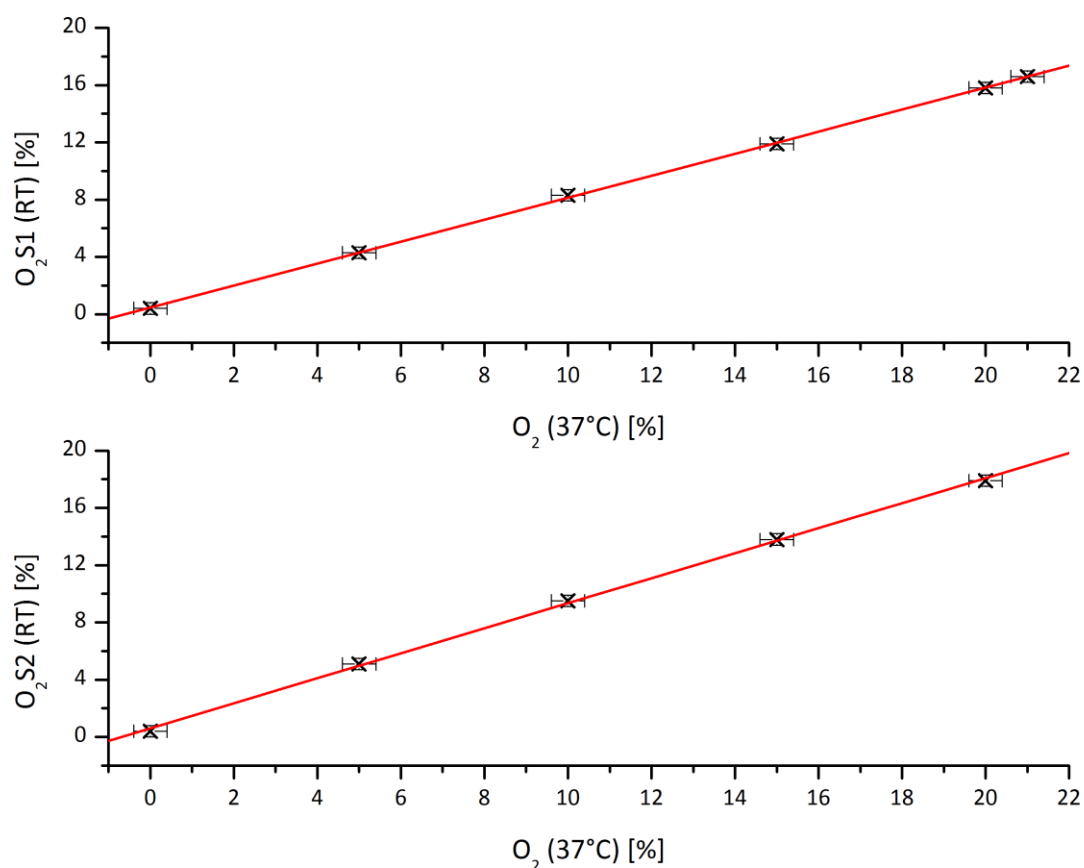


Abbildung 4.7 Linearer Fit des bei Raumtemperatur gemessenen Sauerstoffgehaltes im Zulauf zur Perfusionskammer (O₂S1 (RT)) und im Ablauf der Perfusionskammer (O₂S2 (RT)) bei variierendem Sauerstoffgehalt der Begasung bei 37 °C. Es wurde der bei einer mittleren Raumtemperatur von 23,3 °C gemessene Sauerstoffgehalt des Sensors im Zulauf zur Perfusionskammer (oben) bzw. im Ablauf der Perfusionskammer (unten) gegen die bei 37 °C eingestellte Begasung aufgetragen. Der Fit mit den Gleichungen 3.4 und 3.5 (rote Linie) ergab die Fitparameter A, B, C und D welche zur späteren Rückrechnung des Sauerstoffgehaltes auf 37 °C benötigt wurden. Der Determinationskoeffizient R² des jeweiligen Fits lag in beiden Fällen über 0,999.

Tabelle 4.8 Fitparameter und deren absolute Fehler aus den linearen Zusammenhängen der gemessenen Sauerstoffkonzentration bei Raumtemperatur und der eingestellten Konzentration bei 37 °C. Die Parameter ergaben sich aus dem Fit der Werte aus Tabelle 4.7 mit den Gleichungen 3.4 und 3.5.

A	ΔA	B	ΔB	C	ΔC	D	ΔD
0,46	0,07	0,768	0,005	0,6	0,2	0,87	0,01

4.1.4 Funktionstest des Injektors und der Injektionseinheit

Zur Überprüfung der Funktion des Injektors wurde das für die HTZ-349 übliche Perfusionsmedium mit 1 % D₂O und 50 µM DSS verwendet. Für das Additiv wurde die Konzentration der Aminosäure Threonin im Medium erhöht. Threonin zeigt im Protonenspektrum drei Resonanzen. Bei 7,4 pH resultiert die Resonanz der (H^γ)₃ Protonen in einem Dublett bei 1,32 ppm, die H^α Protonen zeigen ebenfalls ein Dublett bei 3,57 ppm und die H^β Protonen ergeben ein Multiplett bei 4,24 ppm. Das Dublett der (H^γ)₃ Protonen war dabei als einziges Signal nicht überlagert und ausreichend vom Wassersignal entfernt. Dadurch wurde die Wahrscheinlichkeit minimiert, dass es bei potenziellen Verbreiterungen des Wassersignals, welche durch Beeinträchtigungen der magnetischen Homogenität der Probe auftreten konnten, zu einer Beeinflussung des Signals kam.

Im Medium sind unter Berücksichtigung der Verdünnung durch die Zusätze normalerweise 0,738 mM Threonin enthalten. Das Additiv enthielt nach Erhöhung der Konzentration mit insgesamt 4,720 mM etwas mehr als die 6-fache Menge. Das Medium wurde mit 100 µl/min durch die Perfusionskammer gepumpt und dabei mit 21,0 % O₂ und 8,7 % CO₂ bei 37 °C begast. Zeitgleich mit der Injektion wurden die 1D ¹H-NOESY Pulssequenzen am 800 MHz-Spektrometer gestartet. Diese wurden auf eine Aufnahmezeit von ca. 3 min eingestellt, was bei der eingestellten Perfusionsrate in etwa einem kompletten Durchlauf des messsensiblen Bereichs in der Perfusionskammer entsprach. Damit konnte die Dauer bis zum Eintreffen des Mediums im Messbereich, die maximal erreichbare Konzentration in der Kammer und die Zeit, bis nach der vollständigen Injektion und anschließender Perfusion wieder die ursprüngliche Threonin Konzentration erreicht war, bestimmt werden. Zudem wurde die Injektion mit und ohne Agarosegel Faden (ohne Zellen) durchgeführt, um eine potenzielle Beeinflussung durch das Agarosegel zu überprüfen.

Die Ergebnisse zeigten keine wesentliche Beeinflussung durch das Vorhandensein eines Agarosegel Fadens. Für die (H^γ)₃ Protonenresonanzen ergaben sich in beiden Fällen im Rahmen der zeitlichen Auflösung absolut gleiche Zeiten. Nach 29 min konnte ein Anstieg der Threonin-Resonanz beobachtet werden, welches sein Maximum nach 75 min erreichte, wobei die Injektion nach 50 min beendet war und dann wieder Medium aus dem Startbehälter durch die Perfusionskammer gepumpt wurde. Nach insgesamt 144 min war die ursprüngliche Threonin Konzentration wieder erreicht ([Abbildung 4.8](#)).

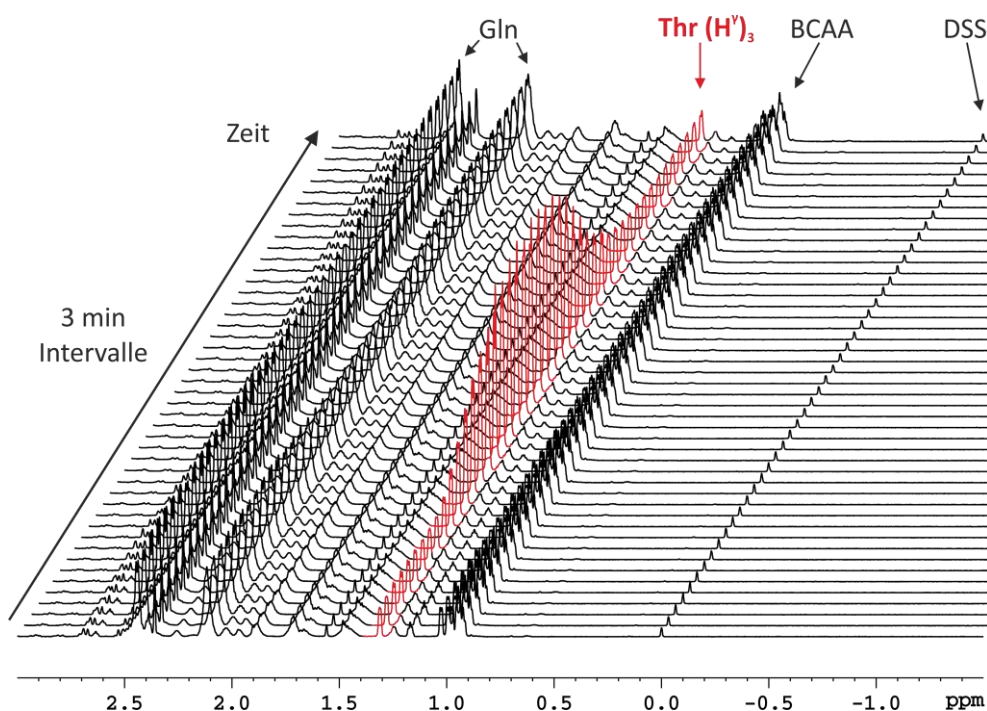


Abbildung 4.8 Zeitliche Entwicklung der Threonin-Resonanz (H^{γ}_3) bei 1,32 ppm in 1D 1H -NOESY-Spektren während einer Injektion mit 4,720 mM Threonin bei einer Injektions- und anschließender Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Aufnahme des ersten Spektrums startete zeitgleich mit der Injektion. Nach ca. 29 min erreichte das Additiv die Perfusionskammer. Die Injektion endete nach 50 min, danach wurde die Perfusion mit dem Standard-Medium gestartet. Die Threonin-Konzentration erreichte 75 min nach Beginn der Injektion ihr Maximum. Nach insgesamt 144 min war die ursprüngliche Threonin-Konzentration wieder erreicht. Die Messung fand bei 37 °C und einer Resonanzfrequenz von 800 MHz statt. Das Medium wurde mit 21,0 % O_2 und 8,7 % CO_2 begast, wodurch ein physiologischer pH-Wert im Perfusionsmedium eingestellt wurde. In der Abbildung sind die verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin mit BCAA (Branched-Chain Amino Acid) abgekürzt. Die gezeigten Spektren wurden auf DSS bei 0,00 ppm geeicht.

Im Versuch ohne Agarosefaden wurden 88 % der maximalen Konzentration erreicht. Im Fall mit Agarosefaden wurde mit 90 % der maximalen Konzentration ein ähnlicher Wert erreicht. Dies zeigte, dass das Volumen des Injektors nicht ausreicht um die vollständige Konzentration des Additivs in der Perfusionskammer zu erreichen.

Der Verlauf der Threonin-Konzentration war identisch für das Threonin Dublett und Multipllett im Fall ohne Agarosegel ([Abbildung 4.9](#)). Bei vorhandenem Gelfaden wurde etwas früher eine höhere Konzentration erreicht, welche dann in ein Sättigungsverhalten überging. Das Additiv staute sich geringfügig in der Perfusionskammer auf, wodurch sich die Threonin-Konzentration akkumulierte. Bei der Perfusion mit Standard-Medium zeigte sich dann eine leicht reduzierte Abnahme der Threonin-Konzentration im Vergleich zum Fall ohne Agarosegel. Diese Effekte waren auf den Agarosefaden zurückzuführen, konnten aber insgesamt vernachlässigt werden, vor allem in Bezug auf die erreichte Maximalkonzentration und dem Threonin-Verlauf im Vergleich zur Situation ohne Gelfaden. Weiterhin zeigte es, dass der Fluss des Mediums durch die Perfusionskammer mit einem 0,5 %igen Agarosefaden nur geringfügig beeinträchtigt wird.

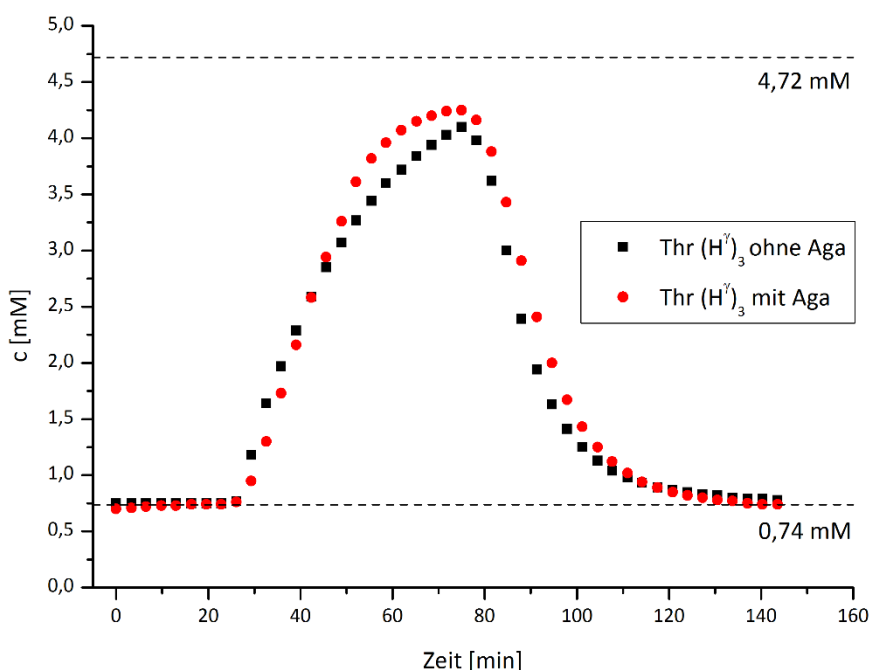


Abbildung 4.9 Verlauf der Threonin-Konzentration in der Perfusionskammer mit und ohne Agarosegel bei einer Injektion mit 4,720 mM Threonin und einer anschließenden Perfusion. Zur Auswertung der Konzentration wurde die $(H^{\gamma})_3$ Protonenresonanz des Threonins verwendet. Die Threonin-Konzentration erreichte im Fall ohne Gelfaden (schwarz) einen Maximalwert von 88 % der im Additiv enthaltenen Konzentration in der Perfusionskammer. Im Fall mit zusätzlichen Agarosefaden ohne Zellen (rot) wurde eine maximale Konzentration von 90 % erreicht. Die Messungen fanden bei 37 °C, 7,4 pH und 800 MHz Resonanzfrequenz statt. Die Injektionsrate und anschließende Perfusionsrate betrug 100 μ l/min.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Injektion eines Additivs über die konstruierte Injektionseinheit mit 100 μ l/min prinzipiell funktionierte. Es bleibt ein Bedarf zur Optimierung der erreichbaren maximalen Konzentration des Additivs in der Perfusionskammer. Dies könnte durch eine geringfügige Erhöhung des Injektionsvolumens erreicht werden.

4.2 ^1H -NMR-sichtbare Metaboliten der untersuchten Zelllinien

Das Protonenspektrum der Zelllinie HTZ-349 zeigte unter anderem breite Resonanzen von mobilen Lipiden und Proteinen (Abbildung 4.10 A). Die Signalverbreiterung dieser und anderer intrazellulärer Metaboliten wurde durch die Einschränkung der Beweglichkeit der Moleküle durch die zelluläre Struktur verursacht. Nur wenige Metaboliten, wie das Stoffwechselprodukt Laktat, zeigten eine scharfe Resonanz im Spektrum der Zellen, da ihre Mobilität im extrazellulären Raum nicht behindert wurde.

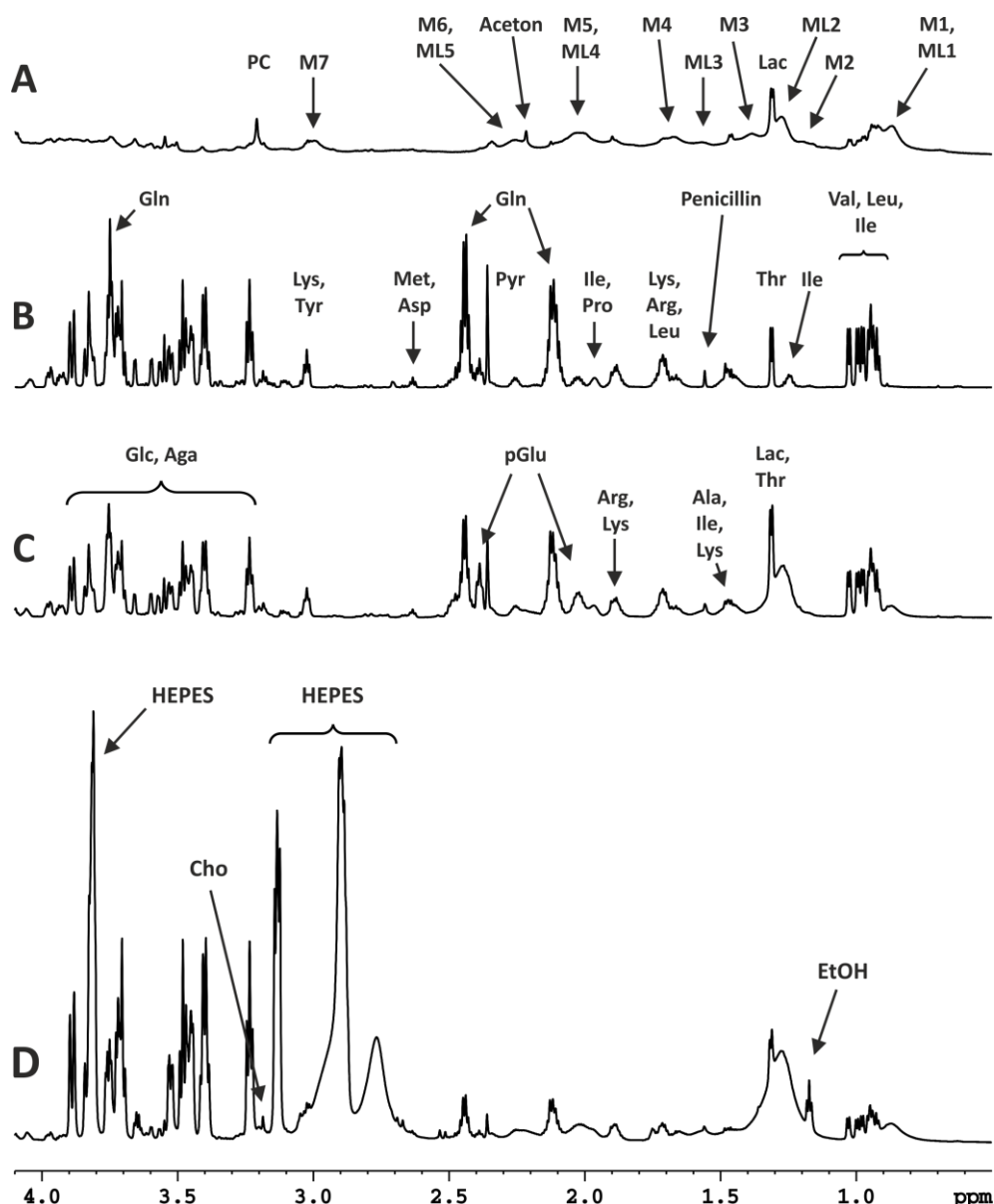


Abbildung 4.10 ^1H -NMR-sichtbare Metaboliten der verwendeten Zelllinien und des Perfusionsmediums im Bereich von 0,50 - 4,00 ppm. **A)** Protonenspektrum von 6 Millionen HTZ-349 in PBS. Es sind hauptsächlich breite, intrazelluläre Lipid- und Proteinresonanzen sichtbar (ML1 - ML5 und M1 - M7). Aceton, Phosphocholin und Laktat sind die einzigen schmalen, extrazellulären Resonanzen. **B)** Protonenresonanzen des verwendeten Perfusionsmediums für die Zellen der Zelllinie HTZ-349. Das Spektrum besteht ausschließlich aus schmalen Resonanzen. Die beiden Hauptmetaboliten für Tumorzellen Glukose und Glutamin sind am stärksten ausgeprägt. **C)** ^1H -Spektrum von 6 Millionen HTZ-349 in 300 μl 0,5%igem Agarosegel bei einer Perfusion mit 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Das Spektrum zeigt die metabolische Zusammensetzung nach 66-stündiger Perfusion unter physiologischen Bedingungen. Es weist eine Kombination aus den breiten Lipidsignalen der Zellen und den schmalen Resonanzen des Mediums auf. **D)** Protonenspektrum von 6 Millionen ReNCX Zellen in 300 μl 0,5%igem Agarosegel bei einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Das Spektrum wurde ebenfalls nach 66-stündiger Perfusion unter physiologischen Bedingungen aufgenommen. Es zeigt stärkere Lipidresonanzen als die Glioblastom-Zellen. Zudem enthielt das Medium der Stammzellen eine etwa dreimal so große Glukose-Konzentration und einen HEPES-Puffer. Bei Ethanol (EtOH) handelt es sich um eine Verunreinigung aus der Probenvorbereitung und nicht um einen metabolischen Beitrag durch die Stammzellen. Alle abgebildeten Spektren waren 1D ^1H -NOESY-Spektren, aufgenommen bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz und einer Temperatur von 37 °C. Alle abgebildeten Spektren wurden auf DSS bei 0,00 ppm geeicht.

Das Perfusionsmedium bestand dementsprechend ausschließlich aus schmalen Resonanzen, welche hauptsächlich von Glukose, Aminosäuren, Pyruvat und den Antibiotika stammten. Glukose und Glutamin wiesen die höchsten Konzentrationen im Medium auf, da sie den Ausgangspunkt für alle wichtigen Stoffwechselvorgänge in den Tumorzellen, wie Lipid-,

Protein-, Aminosäuren- und Nukleotid-Synthese bildeten [DeBerardinis et al. 2008; Mayers & Vander Heiden 2015].

Die kontinuierliche Perfusion mit dem Medium führte zu einer teilweisen Überlagerung der Metaboliten aus dem Medium mit den Zellsignalen ([Abbildung 4.10 B und C](#)), wodurch die Auswertung der metabolischen Veränderungen erschwert wurde. Für viele Metaboliten konnte aber eine geeignete Resonanz gefunden werden, bei der keine oder eine vernachlässigbare Beeinflussung durch überlagernde Signale stattgefunden hat.

Das Protonenspektrum der Stammzelllinie ReNCX unter Perfusion zeigte im Vergleich zu der Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 stärker ausgeprägte Lipidresonanzen. Zudem enthielt das Medium einen HEPES Puffer, dessen Resonanzen vor allem im Bereich von 2,62 – 3,17 ppm das Spektrum stark überlagerten. Im Vergleich zum Medium, welches für die Tumorzellen verwendet wurde, war im Stammzellmedium außerdem eine über dreimal so hohe Glukose-Konzentration enthalten ([Abbildung 4.10 D](#)). Außerdem waren in den Spektren der Stammzelllinie ReNCX auch Resonanzen von Ethanol sichtbar. Analysen des zeitlichen Verlaufs von Ethanol zeigten eine geringfügige Abnahme über die gesamte Messung. Zusammen mit der Tatsache, dass Ethanol auch im Medium ohne Zellen in derselben Konzentration enthalten war, lässt sich daraus folgern, dass Ethanol eine Verunreinigung durch Desinfektionsmaßnahmen während der Herstellung des Mediums war. Ein metabolischer Beitrag zu den Ethanol-Resonanzen durch die Stammzellen ist daher ausgeschlossen, lediglich eine geringe Aufnahme durch die Zellen wäre möglich gewesen.

In [Tabelle 4.9](#) wurden die mit 1D ^1H -NMR-sichtbaren Resonanzen einer typischen Perfusionsmessung beider verwendeten Zelllinien aufgelistet. Die Auswahl der Metaboliten für die weitere Auswertung (grau unterlegt) erfolgte nach Kriterien wie Bedeutung für Tumor- bzw. Stammzellmetabolismus, Beeinflussung durch benachbarte Resonanzen und Sensibilität gegenüber pH-Veränderungen.

Tabelle 4.9 Auflistung der ^1H -NMR-sichtbaren Substanzen der verwendeten Zelllinien im spektralen Bereich von 0,00 - 15,00 ppm. Die Substanzen sind in der Reihenfolge der chemischen Verschiebung δ der Resonanzen aufgelistet. Zudem wurde die Multiplizität des Signals angegeben [Wishart et al. 2013]. Alle Angaben beziehen sich auf 1D ^1H -NOESY-Spektren bei einer Perfusionrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einem pH-Wert von 7,4 pH. Resonanzen, die zur weiteren metabolischen Analyse verwendet wurden, sind grau unterlegt. Abkürzungen: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett), dd (Dublett an Dubletts), ddd (Dublett an Dubletts an Dubletts), dt (Dublett an Triplets), b (verbreitertes Signal)

δ [ppm]	Substanzen	Multiplizität	Anmerkungen
0,00	DSS	s	NMR Standard
0,63	DSS	m	NMR Standard
0,87	ML1	b	-CH ₃ Lipide
0,87 + 0,92	M1	b	Mobile Proteine (Val, Leu, Ile)
0,93	Ile	t	
0,95	Leu	t	
0,98	Val	d	
1,00	Ile	d	
1,03	Val	d	
1,17	EtOH	t	Von Desinfektion

1,20	M2	b	Mobile Proteine (Thr, Ile)
1,25	Ile	m	
1,28	ML2	b	-(CH ₂) _n - Lipide
1,32	Lac, Thr	d, d	Überlagerung bei pH 7,4
1,38 - 1,52	Lys, Ile	m, m	
1,39	M3	b	Mobile Proteine (Ala)
1,47	Ala	d	
1,48	Penicillin	s	
1,56	Penicillin	s	
1,57	ML3	b	-OOC-CH ₂ -CH ₂ - Lipide
1,60 - 1,75	Arg, Leu, Lys	m, m, m	
1,68	M4	b	Mobile Proteine (Lys, Leu, Arg)
1,84 - 1,92	Lys, Arg	m, m	
1,93 - 2,08	Ile, pGlu, Pro, Glu	m, m, m, m	
2,01	ML4	b	=CH-CH ₂ -CH ₂ - Lipide
2,04	M5	b	Mobile Proteine (Gln, Glu, Met, Pro, Val)
2,07 - 2,22	Gln, Met, Glu	m, m, m	
2,23	ML5	b	-OOC-CH ₂ -CH ₂ - Lipide
2,26	M6	b	Mobile Proteine (Pro, Glu)
2,26	Val	m	
2,30 - 2,38	Glu, Pro	m, m	Hauptsächlich Glu
2,36	Pyr	s	
2,39	pGlu	m	
2,38 - 2,53	Gln	m	
2,48 - 2,54	pGlu	m	
2,62 - 3,17	HEPES	m+b	Nur bei ReNCX Medium
2,62 - 2,69	Met, Asp	d, t, dd	
2,80	Asp	dd	
2,91	DSS	m	
2,99	M7	b	Mobile Proteine (Lys, Tyr, Cys, Phe)
3,02	Lys, Tyr	t, dd	
3,10	His, Phe	dd, m	
3,19	Cho, Tyr	s, dd	Hauptsächlich Cho
3,19 - 3,21	GPC, PC, His	s, s, dd	Hauptsächlich GPC
3,24	Glc	dd	
3,26 - 3,29	Phe	m	
3,30 - 3,37	Pro	dt	
3,38 - 3,54	Glc, Aga, Trp, Pro	m, b, dd, m	
3,55	Gly	s	
3,57	Thr	d	
3,60	Val	d	
3,65	EtOH	q	Von Desinfektion
3,66	Ile	d	
3,69 - 3,77	Glc, Gln, Glu, Lys, Leu	m, t, dd, t, m	
3,80 - 3,86	Glc, Met, Ser, HEPES	m, dd, dd, m	HEPES nur bei ReNCX
3,88 - 3,90	Glc, Asp	dd, dd	

3,91 - 3,99	Ser, His, Tyr	m, dd, dd	
4,05	Cho, Trp	ddd, dd	
4,10	Lac, Pro, Aga	q, dd, b	Hauptsächlich Lac
4,16	pGlu	dd	
4,24	Thr	m	
5,10 - 5,18	Aga	b	
5,22	Glc	d	
5,30	ML6	b	-CH=CH- Lipide
6,72 - 6,92	Gln	b	NH ₂ Resonanz (H ^{ε22})
6,89	Tyr	m	
7,05	His	d	pH Referenz (H ^{δ2})
7,19	Tyr, Trp	m, m	
7,28	Trp	m	
7,31 - 7,44	Phe, Trp	d+m, s	Hauptsächlich Phe
7,42 - 7,66	Gln	b	NH ₂ Resonanz (H ^{ε21})
7,54	Trp	d	
7,73	Trp	d	
7,76	His	d	pH Referenz (H ^{ε1})
8,44	Methansäure	s	(=Ameisensäure)

Die Zuordnung der Resonanzen sowie die Bestimmung der Multipllett-Struktur erfolgte unter Verwendung der „Human Metabolome Database“ (HMDB) [Wishart et al. 2013] und der „Biological Magnetic Resonance Data Bank“ (BMRB) [Ulrich et al. 2008]. Des Weiteren wurde grundlegende Literatur für die Zuordnung der mobilen Lipide [Delikatny et al. 2011; Di Vito et al. 2001; Ferretti et al. 1999; Hakumäki & Kauppinen 2000; Luciani et al. 2009] und der mobilen Proteine [Behar et al. 1994; Behar & Ogino 1993; Luciani et al. 2009; Opstad et al. 2008] verwendet.

Der metabolische Verlauf der mobilen Proteine war auf Grund der Nähe zu den mobilen Lipidsignalen in den 1D Spektren nur eingeschränkt auswertbar. Bei den Zellen der Zelllinie HTZ-349 war zu Beginn einer Perfusionsmessung der Lipidanteil noch sehr gering, weswegen die Proteinresonanzen gut sichtbar waren. Allerdings nahm der Anteil der mobilen Lipide im Laufe einer Messung deutlich an Intensität zu, wodurch die meisten Proteinsignale komplett überlagert wurden ([Abbildung 4.11](#)). Lediglich die Resonanz M7 war nur wenig oder nicht von den Lipiden überlagert. Unter Stressbedingungen wie pH-Veränderungen oder Hypoxie war eine verstärkte Zunahme der Lipidanteile zu beobachten, aber auch unter normoxischen Bedingungen war die Konzentration der mobilen Lipide gegen Ende einer 72-stündigen Perfusionsmessung deutlich größer als die der Proteine. Im Fall der Zelllinie ReNCX war der Lipidanteil im Vergleich zu den Glioblastom-Zellen allgemein höher. Dadurch waren die Proteinresonanzen bereits zu Beginn einer Perfusionsmessung stark überlagert und die Sichtbarkeit der Proteinsignale zusätzlich erschwert. Zudem wurde die Proteinresonanz M7 hier noch geringfügig von HEPES überlagert, wodurch die Auswertung ebenfalls erschwert wurde.

Für eine Charakterisierung der NMR-sichtbaren Proteinresonanzen wurden zusätzlich Zellen der Zelllinie HTZ-349 in Medium mit ^{15}N -markierten Aminosäuren kultiviert und mittels zweidimensionaler HSQC-Pulsprogramme analysiert (siehe [Kapitel 4.7](#)).

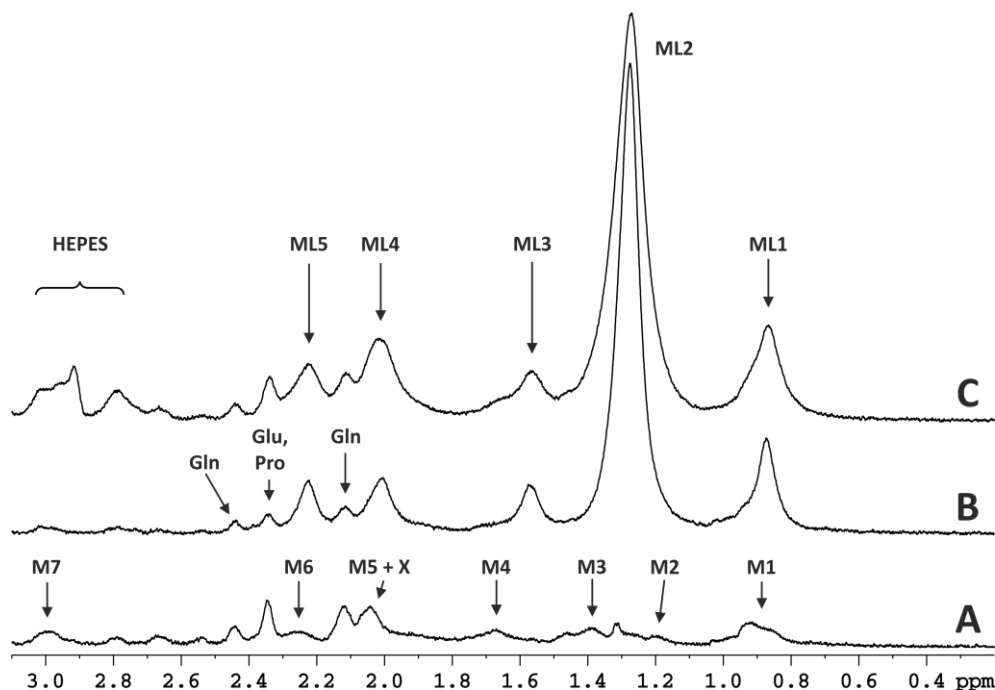


Abbildung 4.11 NMR-sichtbare mobile Protein- und Lipidresonanzen in diffusionsgewichteten ^1H -Spektren der Zelllinien HTZ-349 und ReNCX im Bereich von 0,40 - 3,00 ppm. **A)** Spektrum zu Beginn einer Perfusionsmessung mit Zellen der Zelllinie HTZ-349. Sichtbar sind hauptsächlich mobile Proteinresonanzen (M1 - M7) und intra- sowie verbleibende extrazelluläre Anteile von Glutamin, Glutamat und Prolin. M5 + X steht für die Überlagerung der Proteinresonanz M5 mit Pyro-Glutamat, Glutamat und Prolin. **B)** Spektrum der Zelllinie HTZ-349 nach 72 Stunden Perfusion und einer 22-stündigen hypoxischen Phase. Die Resonanzen der mobilen Proteine sind deutlich von Lipidresonanzen (ML1 - ML5) überlagert worden. ML1 ist dabei die Resonanz von Methylgruppen, ML2 die Resonanz von Methylengruppen, ML3 und ML5 sind Resonanzen von gesättigten Fettsäuren und ML4 eine Resonanz von ungesättigten Fettsäuren. **C)** Spektrum zu Beginn einer Perfusionsmessung mit Zellen der Zelllinie ReNCX. Die Lipidresonanzen sind bereits zu Beginn so stark ausgeprägt, dass die Proteinresonanzen komplett überlagert sind. Alle Spektren wurden bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufgezeichnet. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: $b\text{-Wert} = 7,4 \cdot 10^9 \text{ s}/\text{m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = 0,51 T/m. Die gezeigten Spektren wurden auf DSS bei 0,00 ppm geeicht.

4.3 Metabolische Untersuchungen der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349

In diesem Kapitel wurde der Metabolismus der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 näher beleuchtet. Dafür wurden die Tumorzellen sowohl mit als auch ohne Perfusion bei unterschiedlichen Bedingungen im NMR-Spektrometer untersucht und dessen Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Zellen analysiert. Untersucht wurden für den Tumormetabolismus wichtige Metaboliten wie Glukose, Pyruvat und Laktat, aber auch der Glutamin-Metabolismus

und dessen spontane Umwandlung zu Pyro-Glutamat im Medium. Des Weiteren wurde der Verlauf weiterer Aminosäuren sowie der Lipidmetabolismus der Zellen analysiert.

4.3.1 HTZ-349 ohne Perfusion

Als Referenz für spätere Perfusionsmessungen wurde der zeitliche metabolische Verlauf der ausgewählten Metaboliten der Zelllinie HTZ-349 zunächst ohne Perfusion untersucht. Dazu wurden 6 Millionen HTZ-349 Zellen zusammen mit 300 µl Agarose, wie in [Kapitel 3.3](#) beschrieben, zu einem Faden geformt, welcher in der mit 2 ml Medium gefüllten Perfusionskammer positioniert wurde. Ohne kontinuierlichen Fluss des Mediums konnte das Medium nicht begast werden, wodurch sowohl die Messung des Sauerstoffgehaltes als auch die Anpassung des pH-Werts nicht möglich waren. Hauptsächlich durch die Akkumulation des Metaboliten Laktat war die Kapazität des Natriumhydrogencarbonat Puffers schnell erschöpft, wodurch sich ein saurer mittlerer pH-Wert von $6,53 \pm 0,04$ pH über die gesamte Messdauer von 72 Stunden einstellte ([Abbildung 4.12](#)). Die Zellvitalität wurde aus diesem Grund und wegen Sauerstoff- und Nährstoffmangel stark beeinträchtigt, so dass nach Beendigung der Messung nur noch 6 % der 6 Millionen Zellen am Leben waren.

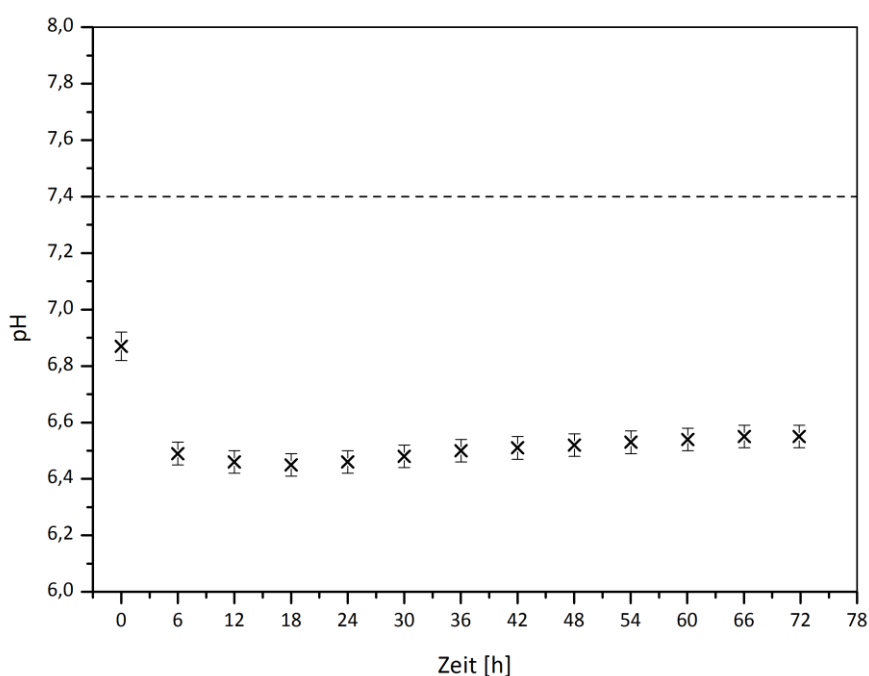
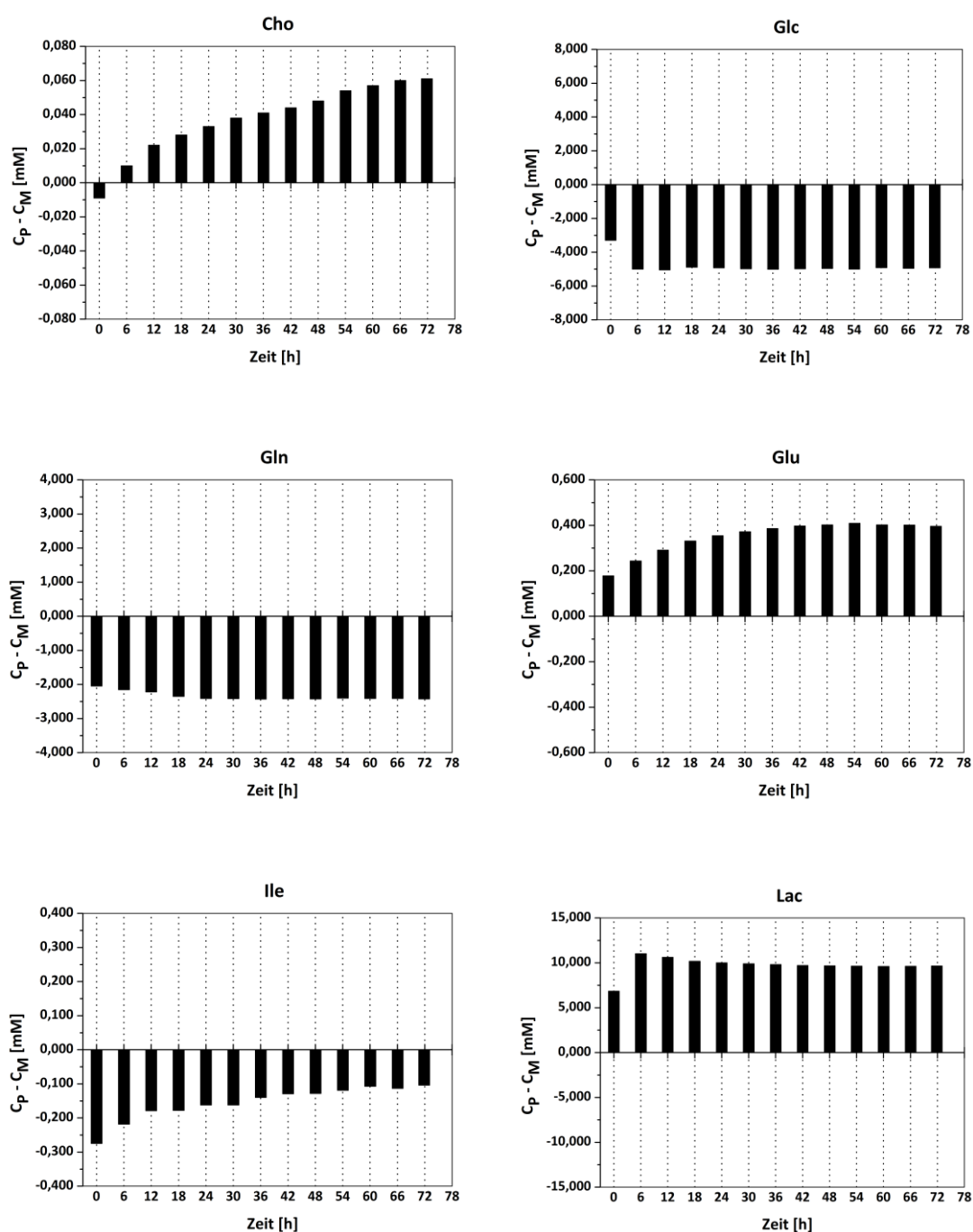


Abbildung 4.12 Verlauf des pH-Wertes in der Perfusionskammer bei 6 Millionen HTZ-349 ohne Perfusion über 72 Stunden. Der physiologische pH-Wert von 7,4 pH wird durch die gestrichelte Linie angezeigt. Die Messung fand bei 37 °C und einer Resonanzfrequenz von 800 MHz statt. Für die Darstellung wurde ein Messintervall von 6 Stunden verwendet. Die chemische Verschiebung der $H^{\epsilon 1}$ -Resonanz des Histidins wurde durch ein 1D 1H -NOESY bestimmt und in die entsprechenden pH-Werte umgerechnet.

Die metabolische Auswertung erfolgte durch 1D ^1H -NOESY-Spektren, welche im 2 Stunden-Takt aufgezeichnet wurden, wobei die jeweilige Aufnahmedauer ca. 11 min betrug. Für die Evaluation wurden die Spektren in einem Intervall von 6 Stunden ausgewertet. In [Abbildung 4.13](#) wurde der Verlauf der Konzentration der ausgewählten Metaboliten abzüglich der im Medium enthaltenen Konzentration dargestellt. Für die Metaboliten Cholin, Glutamat, Laktat und Pyro-Glutamat zeigten sich erhöhte Werte, während die Konzentrationen der Metaboliten Glukose, Glutamin, Isoleucin, Phenylalanin, Pyruvat, Tyrosin und Valin im Vergleich zur im Medium vorhandenen Konzentration reduziert waren.



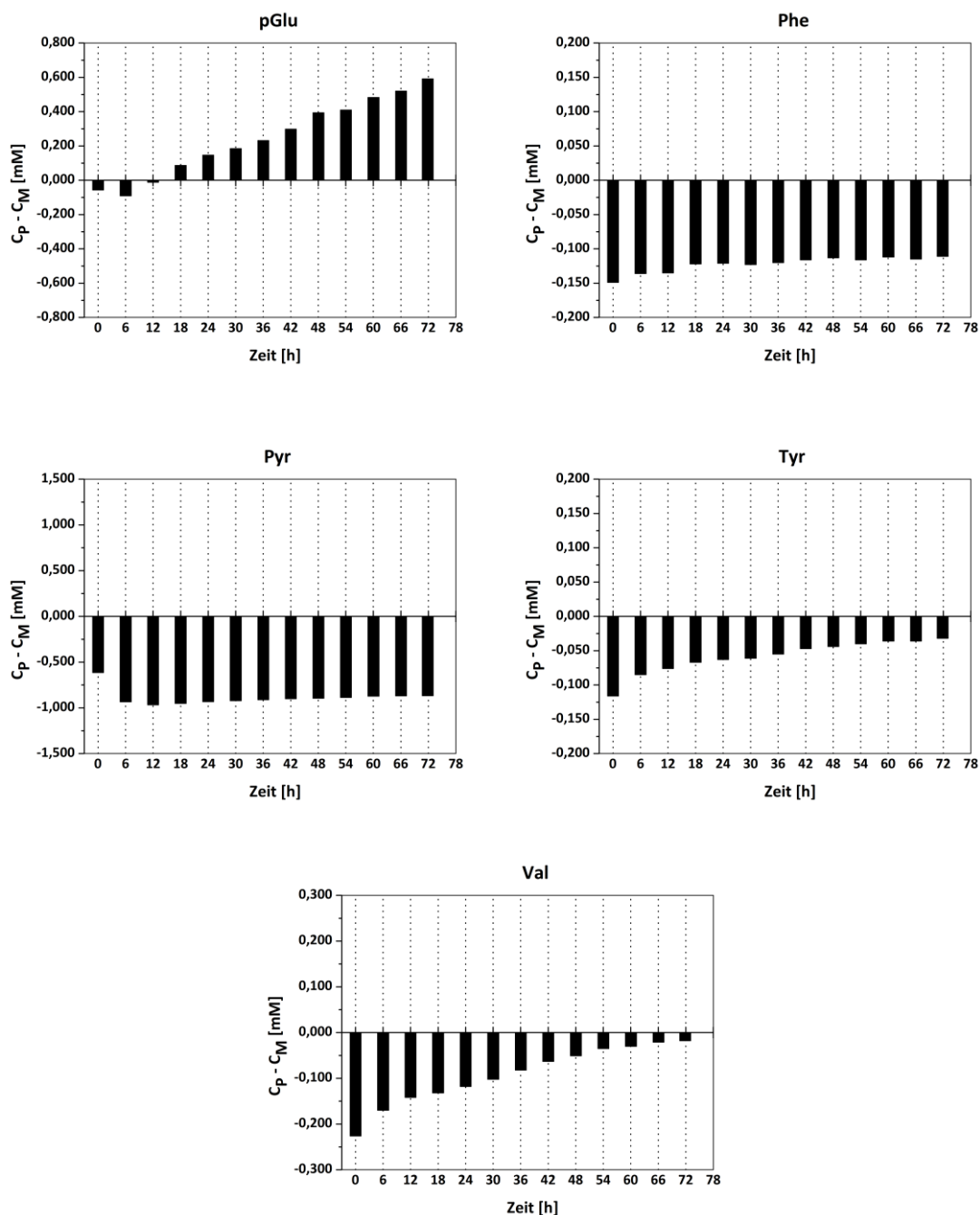


Abbildung 4.13 Zeitlicher Verlauf der Konzentration ausgewählter Metaboliten von 6 Millionen HTZ-349 ohne Perfusion. Gezeigt ist die Differenz der Konzentration der Metaboliten in der Perfusionskammer (C_P) mit der im Medium enthaltenen Konzentration (C_M) in 6 Stunden Intervallen. Die Konzentrationen wurden aus 1D ^1H -NOESY-Spektren (11 min Aufnahmezeit, 64 Scans) bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und mit dem NMR-Standard DSS bestimmt, dessen Konzentration im Perfusionsmedium 50 μM betrug.

Die für Tumorzellen wichtigsten Metaboliten Glukose und Glutamin [Mayers & Vander Heiden 2015] sowie Pyruvat zeigten die erwartete verstärkte Aufnahme durch die Zellen. Die 6 Millionen Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 wiesen über eine gesamte Messdauer von 72 Stunden in den 2 ml Medium im NMR-Röhrchen eine Abnahme der Konzentration von Glukose (3,470 mM), von Glutamin (1,145 mM) und von Pyruvat

(0,740 mM) auf (Tabelle 4.10). Die Abnahme der Glukose-Konzentration entsprach bereits im ersten Messintervall über 60 % des im Medium enthaltenen Anteils. Im zweiten Messintervall, nach 12 Stunden, erreichte die Glukose-Konzentration mit 97 % Verbrauch im Messbereich sein Maximum, welches dann bis zum Ende der Messung konstant blieb. Ähnlich verhielt sich Pyruvat, wobei hier eine maximale Abnahme der Konzentration von 84 % verzeichnet wurde. Glutamin erreichte die größte Abnahme von 44 % der im Medium enthaltenen Konzentration allerdings erst nach 24 Stunden, wobei die Konzentration analog zur Glukose bereits im ersten Intervall stark reduziert war (ca. 37 % des Ausgangswertes). Laktat zeigte ein zu Glukose und Pyruvat entgegengesetztes Verhalten und dementsprechend stark war die Laktat-Synthese ausgeprägt. Insgesamt konnten 8,364 mM Laktat im Überstand nach der Messung nachgewiesen werden. Die Tumorzellen haben also im Fall ohne Perfusion innerhalb von nur 6 Stunden nahezu die gesamte Glukose und den Großteil des Pyruvats im Messbereich der Perfusionskammer durch Glykolyse zu Laktat umgewandelt.

Der Verlauf von Cholin und Pyro-Glutamat zeigte in beiden Fällen einen deutlichen Anstieg, wobei letztlich nur Pyro-Glutamat mit einer Zunahme um 0,404 mM im Überstand erhöht war. Die deutliche Vergrößerung der Konzentration des Pyro-Glutamats war dabei auf eine spontane, nicht-enzymatische Umwandlung aus Glutamin unter Abspaltung von Ammoniak (NH_3) zurückzuführen [Kumar & Bachhawat 2012]. Ein Beitrag zellulärer Prozesse konnte über Reproduktion der Ergebnisse durch Vergleichsmessungen ohne Zellen ausgeschlossen werden. Erhöhte Cholin-Konzentrationen sind ein Kennzeichen von Tumorzellen und werden mit Onkogenese und Tumorentwicklung in Verbindung gebracht [Glunde et al. 2011].

Tabelle 4.10 Konzentrationen der untersuchten Metaboliten der Zelllinie HTZ-349 ohne Perfusion. C_M ist die im Perfusionsmedium enthaltene Konzentration der Metaboliten. C_P ist die Konzentration der Metaboliten in der Perfusionskammer, dabei ist C_P^S die Konzentration zu Beginn und C_P^E die Konzentration am Ende der Messung nach 72 Stunden. Die Konzentrationen C_P enthalten sowohl intra- als auch extrazelluläre Anteile. C_U ist die Konzentration der Metaboliten im Überstand der Zellen nach der Messung. Da C_U nur extrazelluläre Metaboliten enthält, beschreibt die Differenz $C_U - C_M$ die Synthese bzw. den Verbrauch des jeweiligen Metaboliten über die gesamte Messdauer. Für die Bestimmung der Konzentrationen wurden 1D ^1H -NOESY-Spektren bei 37 °C und 800 MHz Resonanzfrequenz aufgezeichnet.

Metabolit	C_M [mM]	C_P^S [mM]	C_P^E [mM]	C_U [mM]	$C_U - C_M$ [mM]
Cho	0,033	0,024	0,094	0,037	+ 0,004
Glc	5,133	1,840	0,209	1,663	- 3,470
Gln	5,545	3,498	3,122	4,400	- 1,145
Glu	0,092	0,270	0,488	0,146	+ 0,054
Ile	0,740	0,465	0,636	0,678	- 0,062
Lac	0,000	6,844	9,652	8,364	+ 8,364
pGlu	1,335	1,278	1,926	1,739	+ 0,404
Phe	0,369	0,220	0,258	0,335	- 0,034
Pyr	1,155	0,541	0,288	0,415	- 0,740
Tyr	0,365	0,249	0,333	0,341	- 0,024
Val	0,742	0,516	0,724	0,689	- 0,053

In den Zellen kann Glutamat durch die Glutaminase aus Glutamin gebildet werden und dann in den Citratzyklus als α -Ketoglutarat eingespeist werden, oder von den Zellen ausgeschieden

werden. Hier erreichte die Glutamat-Konzentration nach ca. 42 Stunden ein Maximum und war im Überstand um 54 μM erhöht. Die restlichen untersuchten Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin und Valin zeigten eine geringere Konzentration als im Medium, was auf einen Verbrauch durch die Zellen schließen ließ, welcher im Laufe der Messung allerdings abnahm. Im Überstand wurde eine Abnahme der Konzentrationen in einer Größenordnung von 24 - 62 μM nachgewiesen.

Zur Analyse des Lipidmetabolismus wurden diffusionsgewichtete Spektren verwendet, damit die extrazellulären Beiträge des Mediums in den Integralbereichen der mobilen Lipide (ML1 - ML6) auf eine vernachlässigbare Größe abgeschwächt werden konnten. Lediglich einige wenige makromolekulare Resonanzen, welche hauptsächlich von mobilen Proteinen stammten verursachten im Falle der Lipidresonanzen ML1, ML3, ML4 und ML5 eine verbleibende Überlagerung. Diese Resonanzen wiesen allerdings alle eine geringere Intensität als die Lipide im Spektrum auf. Zudem blieb der sichtbare Proteinanteil im Mittel während der gesamten Messung relativ konstant, wie am Beispiel der einzig nicht von mobilen überlagerten Proteinresonanz M7 bei 2,99 ppm nachgewiesen werden konnte ([Abbildung 4.14](#)). Dadurch war der geringfügige Beitrag der Proteine gleichbleibend und beeinflusste nicht den Verlauf der Lipide. ML4 wurde zusätzlich noch durch extrazelluläre Metaboliten wie Pyro-Glutamat und Glutamin überlagert, welche auf Grund ihrer hohen Konzentration bei der gewählten Diffusionswichtung nicht ausreichend abgeschwächt wurden. Allerdings wurde Glutamin im Laufe der Messung durch die Zellen verbraucht, wodurch die Beeinflussung schon nach kurzer Zeit abgeschwächt wurde.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Lipidverläufe wurden die Integrale in [Abbildung 4.14](#) auf den ersten Wert normiert. Für alle Lipidresonanzen ergab sich dabei ein ähnlicher Verlauf. Nach einem 12-stündigen Anstieg der Lipide folgte ein Abfall auf Werte nahe des Ausgangsniveaus. Den stärksten Anstieg zeigte ML2 mit einer Erhöhung auf den 3,5-fachen Ausgangswert, gefolgt von ML6 mit einer Vergrößerung auf das 2,9-fache. Die restlichen Lipidresonanzen erreichten Maximalwerte von 1,2 - 1,8.

Der Anstieg der NMR-sichtbaren mobilen Lipide ist ein Resultat der Stresssituation durch den zunehmenden Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff. Zudem wurde die extrazelluläre Umgebung auf Grund der starken Laktat-Synthese weit in den sauren Bereich verschoben, wie durch die pH-Messung belegt werden konnte. Neben dem starken Anstieg der Methylenresonanzen (ML2) zeigten vor allem die Methingruppe (ML6) eine ausgeprägte Zunahme. Diese ungesättigten Fettsäuren finden unter anderem in den Zellmembranen Verwendung und erhöhen dort deren Fluidität. Ihr starker Zuwachs lässt sich ebenfalls durch einen stressbedingten Wachstumsstopp und der Speicherung in Lipidtröpfchen erklären. Die Abnahme der NMR-sichtbaren Lipidresonanzen nach den ersten 12 Stunden könnte durch einen intrazellulären Abbau verursacht worden sein.

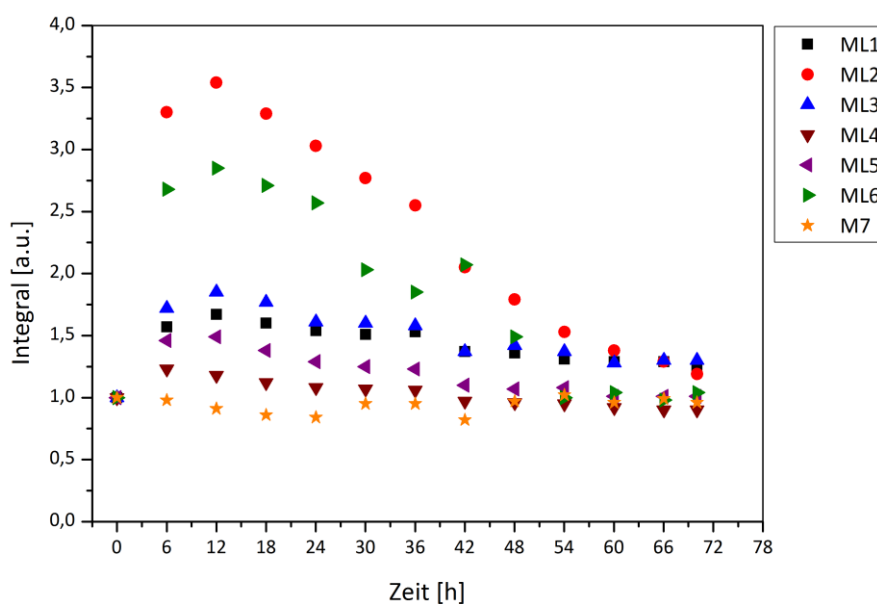


Abbildung 4.14 Verlauf der Integrale der NMR-sichtbaren mobilen Lipide und Proteine der Zelllinie HTZ-349 ohne Perfusion. Dargestellt sind die Integrale der mobilen Lipide (ML1 - ML6) und der Proteinresonanz M7 in 6 Stunden Intervallen. Die Integrale wurden zur besseren Vergleichbarkeit jeweils auf den Ausgangswert normiert. Grundlage für die Abbildung waren diffusionsgewichtete ^1H Spektren bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz und einer Temperatur von 37 °C. ML1 ist die Resonanz von Methylgruppen, ML2 ist die Resonanz von Methylengruppen, ML3 und ML5 sind Resonanzen von gesättigten Fettsäuren und ML4 sowie ML6 sind Resonanzen von ungesättigten Fettsäuren. M7 ist die einzige nicht von mobilen Lipiden überlagerte Proteinresonanz bei 2,99 ppm. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: $b\text{-Wert} = 7,4 \cdot 10^9 \text{ s/m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = 0,51 T/m. Der Gradient wurde so gewählt, dass die niedermolekularen Anteile abgeschwächt wurden.

In [Tabelle 4.11](#) wurde das Verhältnis der mobilen Lipide zu der Methylengruppe (ML2) im Verlauf der Messung angegeben. Der Vergleich zeigte, dass sich die Methylengruppe (ML2) ähnlich wie ML6 über die 70 Stunden entwickelt hatte, da das Verhältnis ungefähr konstant blieb. Die restlichen mobilen Lipide ML1, ML3, ML4 und ML5 zeigten ein Minimum bei 12 Stunden, was durch den starken Anstieg der Methylengruppe verursacht wurde und am Ende der Messung erreichten die Verhältnisse wieder ungefähr das Niveau der Ausgangswerte. ML4 zeigte als einzige Lipidresonanz im Verhältnis zur Methylengruppe zu Beginn und am Ende der Messung größere Werte (Verhältnis >1). Dies resultierte aus der Überlagerung mit der mobilen Proteinresonanz M5 sowie den extrazellulären Metaboliten Pyro-Glutamat und Glutamin.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse nur den Schluss zu, dass eine Betrachtung von lebenden Zellen ohne kontinuierliche Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff nicht sinnvoll ist, da die Zellen sehr schnell einer Vielzahl an Stressbedingungen ausgesetzt sind. Vor allem hoch-glykolytische Zellen wie die humane Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 verbrauchen die Metaboliten Glukose und Pyruvat in kürzester Zeit. Der fehlende Abtransport von metabolischen Produkten wie Laktat führt zu einer raschen Verschiebung des pH-Werts in den sauren Bereich. In kürzester Zeit befinden sich die Zellen daher in einer für sie ungünstigen

Umgebung, was rasch zu einem Wachstumsstopp und Apoptose sowie Nekrose führt. Daher konnten nach 72 Stunden auch nur noch eine Zellvitalität von 6 % festgestellt werden. Dies verdeutlicht dramatisch die Notwendigkeit eines Perfusions-Systems zur metabolische Analyse von lebenden Zellen.

Tabelle 4.11 Verlauf der Verhältnisse der mobilen Lipide der Zelllinie HTZ-349 in Relation zu ML2 ohne Perfusion. Für die Verhältnisse zu ML2 wurden diffusionsgewichtete ^1H Spektren bei 800 MHz und einer Temperatur von 37 °C in einem Intervall von 6 Stunden verwendet. ML1 ist die Resonanz von Methylgruppen, ML2 ist die Resonanz von Methylengruppen, ML3 und ML5 sind Resonanzen von gesättigten Fettsäuren und ML4 sowie ML6 sind Resonanzen von ungesättigten Fettsäuren. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: b-Wert = $7,4 \cdot 10^9 \text{ s/m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = $0,51 \text{ T/m}$.

Zeit [h]	ML6	ML5	ML4	ML3	ML2	ML1
0	0,21	0,60	1,68	0,40	1,00	0,84
6	0,17	0,27	0,63	0,21	1,00	0,40
12	0,17	0,25	0,56	0,21	1,00	0,40
18	0,17	0,25	0,57	0,21	1,00	0,41
24	0,18	0,26	0,60	0,21	1,00	0,43
30	0,15	0,27	0,65	0,23	1,00	0,46
36	0,15	0,29	0,70	0,24	1,00	0,50
42	0,21	0,32	0,80	0,26	1,00	0,56
48	0,18	0,36	0,90	0,31	1,00	0,64
54	0,14	0,43	1,04	0,35	1,00	0,72
60	0,16	0,44	1,12	0,37	1,00	0,79
66	0,16	0,47	1,17	0,40	1,00	0,84
70	0,18	0,51	1,27	0,43	1,00	0,88

4.3.2 HTZ-349 unter Perfusion bei normoxischen Bedingungen

Im Vergleich zur Situation ohne Perfusion wurden 6 Millionen Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 nach der Standardprozedur in einem Agarosefaden eingebettet und unter 70-stündiger Perfusion untersucht. Durch die Perfusionsrate von $100 \mu\text{l/min}$ und der kontinuierlichen Begasung des Mediums mit Sauerstoff und Kohlendioxid konnten optimale Bedingungen für die Zellen in der Perfusionskammer geschaffen werden. Eine zusätzliche Überwachung des Sauerstoffgehaltes im Zulauf zur Perfusionskammer und des pH-Wertes am Ort der Zellen ermöglichte die Aufrechterhaltung physiologischer Bedingungen über die gesamte Messung. Durch die zusätzliche Messung der Sauerstoffkonzentration im Ablauf der Perfusionskammer konnte zudem der Sauerstoffverbrauch der Zellen während der Messung bestimmt werden. Für die Einstellung normoxischer Bedingungen wurde das Medium mit 21,0 % O_2 begast, wodurch sich im Zulauf zur Perfusionskammer im Mittel ein Sauerstoffgehalt von $21,2 \pm 1,2 \%$ nach Rückrechnung auf 37 °C ergab (Abbildung 4.15). Im Ablauf der Perfusionskammer war der gemessene Sauerstoffgehalt zunächst noch erhöht, da

zum Teil noch Medium enthalten war, welches sich vor Anschluss der Perfusionskammer im System befand. Nach einer Einschwingphase war ein stabiler Sauerstoffverbrauch durch die Zellen messbar und es konnte am Sensor im Ablauf ein Ausgangswert von $14,8 \pm 1,3$ % O_2 gemessen werden, welcher im Laufe der Messung kontinuierlich auf einen Endwert von $17,7 \pm 1,3$ % O_2 anstieg.

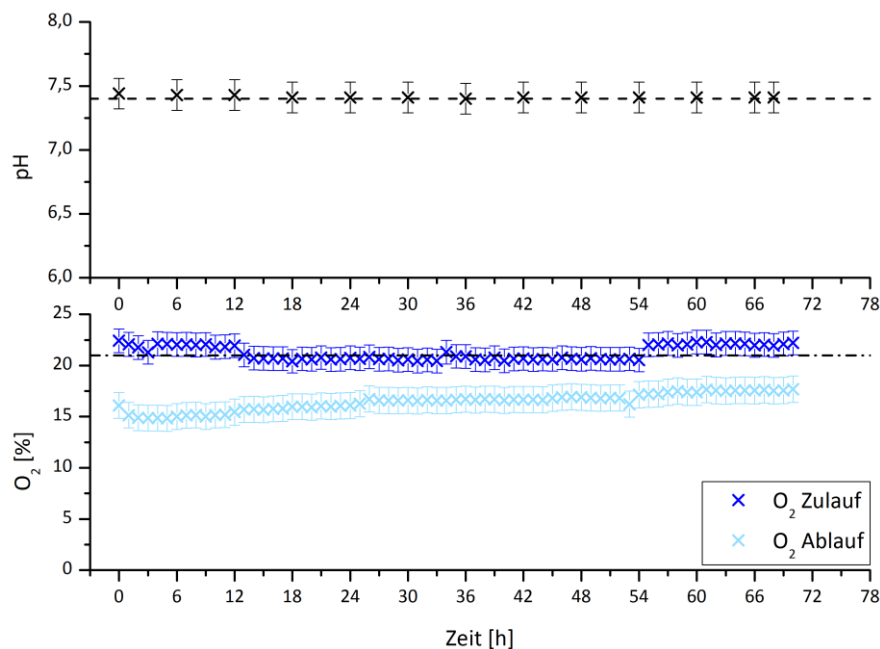
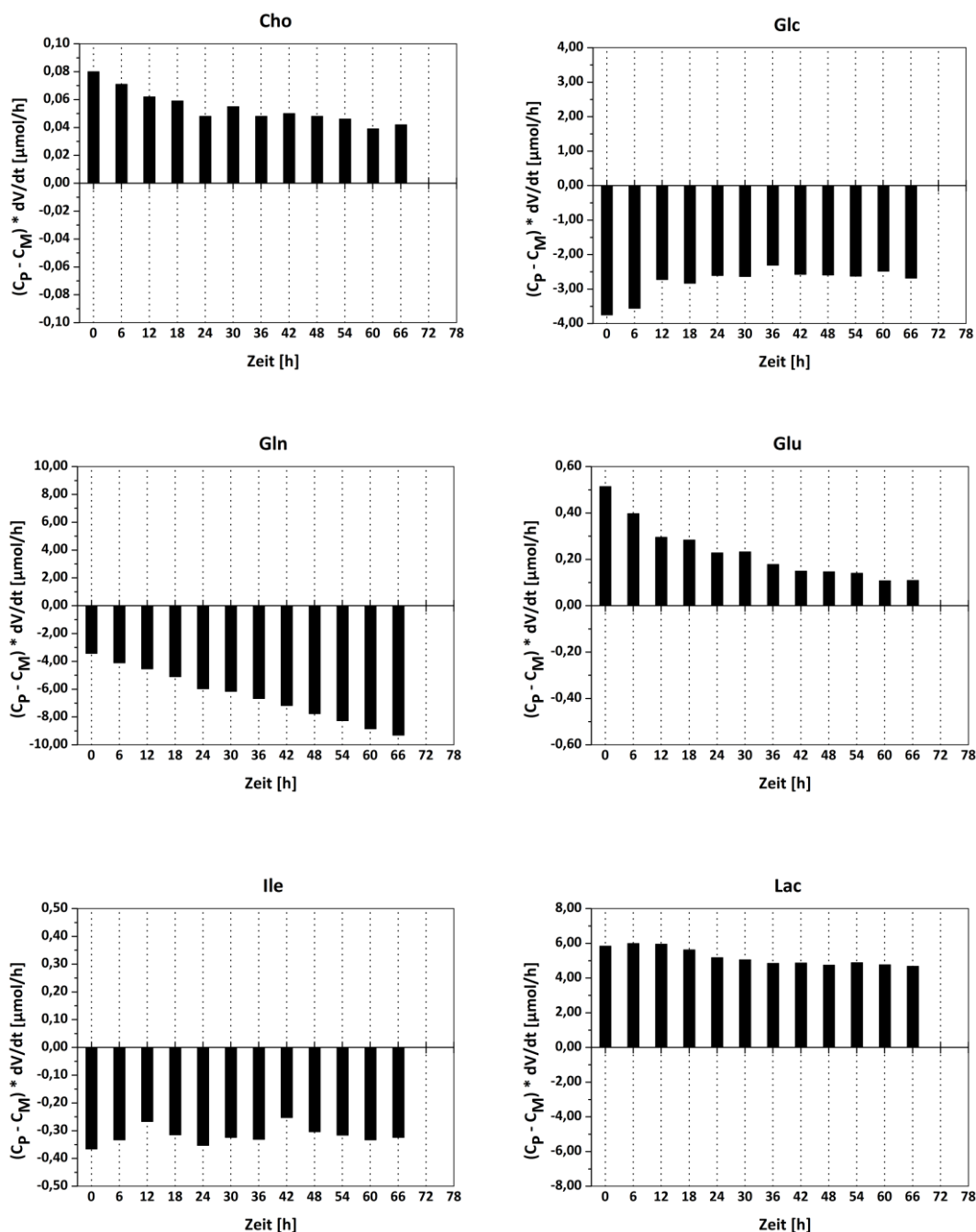


Abbildung 4.15 Verlauf des pH-Wertes in der Perfusionskammer und des Sauerstoffgehaltes im Zu- und Ablauf der Perfusionskammer bei 6 Millionen HTZ-349 unter Perfusion über 70 Stunden, bei normoxischen Bedingungen. **Oben:** Die Einstellung des physiologischen pH-Wertes von 7,4 pH (gestrichelte Linie) erfolgte durch Begasung des Mediums mit 8,7 % CO_2 . Die chemische Verschiebung der $H^{\epsilon 1}$ -Resonanz des Histidins wurde durch 1D 1H -NOESY-Spektren bestimmt und in die entsprechenden pH-Werte umgerechnet. **Unten:** Der Sauerstoffgehalt im Zulauf (dunkelblau) wurde durch die Begasung des Mediums mit 21 % O_2 (strichpunktierte Linie) eingestellt. Der reduzierte Sauerstoffgehalt im Ablauf (hellblau) resultierte aus dem Verbrauch der Zellen. Die dargestellten Sauerstoffwerte wurden bei Raumtemperatur gemessen und auf 37 °C zurückgerechnet. Die Messung in der Perfusionskammer fand bei 37 °C, einer Perfusionsrate von 100 $\mu l/min$ und einer Resonanzfrequenz von 800 MHz statt. Für die Darstellung wurde ein Messintervall von 6 Stunden für den pH-Verlauf und ein Messintervall von einer Stunde für den Sauerstoffverlauf gewählt.

Der Anstieg des gemessenen Sauerstoffgehalts im Ablauf der Perfusionskammer entsprach einer gesamten Reduktion des Sauerstoffverbrauchs um 2,9 % O_2 . Der pH-Wert wurde über die Begasung mit 8,7 % CO_2 während der gesamten Messung im physiologischen Bereich gehalten. Im Mittel betrug der pH-Wert in der Perfusionskammer $7,41 \pm 0,12$ pH. Die Überprüfung der Zellvitalität mittels Trypanblau nach Beendigung der 70-stündigen Messung ergab einen Anteil an lebenden Zellen von 55 %.

Die zeitliche metabolische Auswertung wurde bei den Perfusionsmessungen durch die Konzentrationsdifferenz aus der ermittelten Konzentration in der Perfusionskammer (C_P) und im Medium (C_M) durchgeführt. Um die Flussrate des Mediums mit in die Auswertung einzubeziehen wurde diese Konzentrationsdifferenz mit der Perfusionsrate des Mediums

(dV/dt) multipliziert. Damit ergab sich aus der ursprünglichen Konzentrationsdifferenz eine Differenz der Stoffmengen pro Zeit in der Perfusionskammer. Insgesamt betrachtet wurden dabei im Vergleich zum Perfusionsmedium erhöhte Werte für Cholin, Glutamat, Laktat, Pyro-Glutamat und Valin und verminderte Stoffmengen pro Zeit für Glukose, Glutamin, Isoleucin, Phenylalanin, Pyruvat und Tyrosin in der Perfusionskammer ermittelt ([Abbildung 4.16](#)).



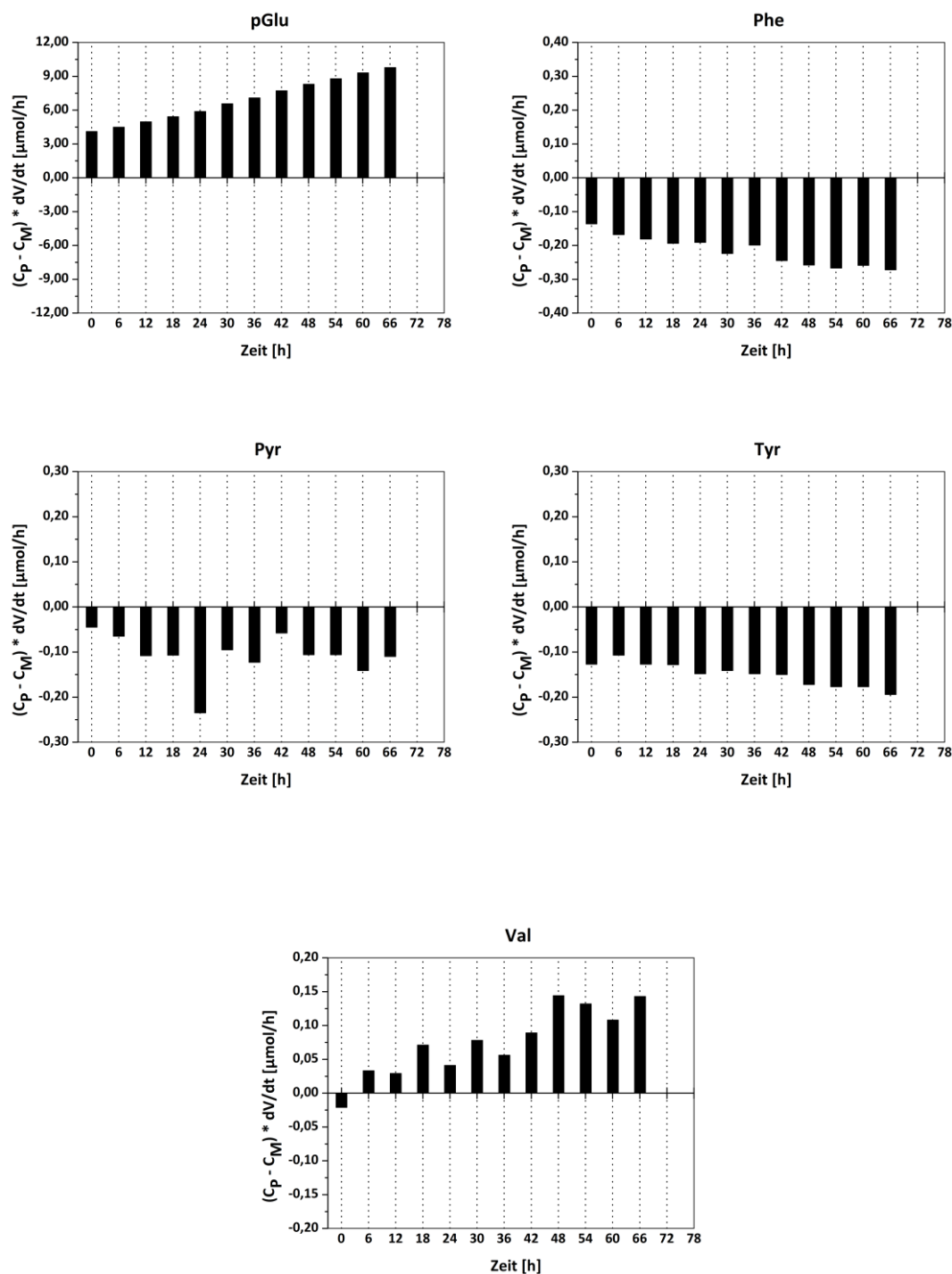


Abbildung 4.16 Zeitlicher Verlauf der Stoffmenge pro Zeit ausgewählter Metaboliten von 6 Millionen HTZ-349 unter Perfusion, bei normoxischen Bedingungen. Gezeigt ist die Differenz der Konzentration der Metaboliten in der Perfusionskammer (C_P) mit der im Medium enthaltenen Konzentration (C_M), multipliziert mit der eingestellten Perfusionsrate (dV/dt) von $100 \mu\text{l/min}$ in 6 Stunden Intervallen. Die Konzentrationen wurden aus 1D ^1H -NOESY-Spektren (11 min Aufnahmezeit, 64 Scans) unter Perfusion, bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz und einer Temperatur von 37°C über den NMR-Standard DSS bestimmt, dessen Konzentration im Perfusionsmedium $50 \mu\text{M}$ betrug. Der erhöhte Verbrauch des Pyruvats bei 24 Stunden wurde durch Überschneidung mit benachbarten Resonanzen auf Grund einer kurzfristigen magnetischen Inhomogenität verursacht.

Die 6 Millionen Zellen unter normoxischen Bedingungen und physiologischem pH-Wert zeigten, wie erwartet, vor allem einen erhöhten Bedarf an Glukose, Glutamin und Pyruvat. Bei der angelegten Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ wurden über 70 Stunden insgesamt ca. 420 ml Medium durch die Perfusionskammer, an den Zellen vorbei, in einen Auffangbehälter gepumpt. In diesem Sammelbehälter konnte eine Konzentrationsänderung von 1,364 mM Glutamin, 0,235 mM Glukose und 81 μM Pyruvat nachgewiesen werden (Tabelle 4.12). Im Vergleich zur Stoffmenge pro Zeit im Medium war der Glutamin-Gehalt bereits im ersten Messintervall um 10 % reduziert und stieg bis zum Ende relativ gleichmäßig auf einen Verbrauch von 28 %. Der Glukosekonsum der Zellen betrug im ersten Messintervall 12 % des vorhandenen Zuckers und sank nach 12 Stunden auf einen Mittelwert von ca. 8 %. Nach dieser Zeit änderte sich der Glukose-Verbrauch praktisch nicht mehr. Der Verbrauch des Pyruvats nahm ebenfalls 12 Stunden lang zu, erreichte ein Maximum von etwa 2 % des im Medium enthaltenen Pyruvats und blieb dann, wie Glukose, konstant. Die Laktat-Synthese nahm nach 12 Stunden ab und erreichte nach 36 Stunden ein konstantes Niveau. Im Medium aus dem Sammelbehälter konnten 0,365 mM nachgewiesen werden. Die Glioblastom-Zellen zeigten also insgesamt ein glykolytisches Verhalten, wie auch schon im Fall ohne Perfusion. Eine genaue Untersuchung des Glukoseverbrauchs im zeitlichen Verlauf wird in Kapitel 4.5 beschrieben.

Tabelle 4.12 Stoffmengen pro Zeit und Konzentrationen der untersuchten Metaboliten der Zelllinie HTZ-349 unter normoxischen Bedingungen. Die Multiplikation der Konzentration der Metaboliten im Medium (C_M) mit der verwendeten Perfusionsrate (dV/dt) von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ beschreibt die Stoffmenge pro Zeit, welche in der Perfusionskammer ohne Zellen gemessen werden würde. C_P^S ist die tatsächlich gemessene Konzentration der Metaboliten in der Perfusionskammer mit Zellen zu Beginn und C_P^E die Konzentration am Ende der Messung. $C_P^S \cdot dV/dt$ und $C_P^E \cdot dV/dt$ beschreiben dementsprechend die gemessene Stoffmenge pro Zeit in der Perfusionskammer mit Zellen zu Beginn und am Ende der Messung nach 70 Stunden. Die Konzentrationen C_P enthalten sowohl intra- als auch extrazelluläre Anteile. Die Variable C_A ist die Konzentration der Metaboliten im Auffangbehälter nach der Messung. Da C_A nur extrazelluläre Metaboliten enthält, beschreibt die Differenz $C_A - C_M$ die Synthese bzw. den Verbrauch des jeweiligen Metaboliten über die gesamte Messdauer. Für die Bestimmung der Konzentrationen wurden 1D ^1H -NOESY-Spektren unter Perfusion, bei 37 °C und 800 MHz Resonanzfrequenz aufgezeichnet.

Metabolit	$C_M \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	$C_P^S \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	$C_P^E \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	C_M [mM]	C_A [mM]	$C_A - C_M$ [mM]
Cho	0,198	0,276	0,240	0,033	0,017	- 0,016
Glc	30,798	27,048	28,296	5,133	4,898	- 0,235
Gln	33,270	29,838	23,862	5,545	4,181	- 1,364
Glu	0,552	1,068	0,642	0,092	0,073	- 0,019
Ile	4,440	4,074	4,146	0,740	0,710	- 0,030
Lac	0,000	5,838	4,710	0,000	0,365	+ 0,365
pGlu	7,476	11,592	17,538	1,246	2,420	+ 1,174
Phe	2,214	2,076	1,944	0,369	0,386	+ 0,017
Pyr	6,930	6,882	6,792	1,155	1,074	- 0,081
Tyr	2,190	2,064	2,016	0,365	0,348	- 0,017
Val	4,452	4,428	4,638	0,742	0,756	+ 0,014

Glutamat und Cholin zeigten im Vergleich zum Medium leicht erhöhte Werte in der Perfusionskammer, welche in beiden Fällen im Verlauf der Messung abnahmen. Im Sammelbehälter wurde bei beiden Metaboliten allerdings nur eine minimale Konzentrationsabnahme von 19 μM im Falle des Glutamats und 16 μM bei Cholin nachgewiesen. Die erhöhten Werte in der Perfusionskammer sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf intrazelluläre Anteile von Cholin und Glutamat zurückzuführen.

Im zeitlichen Verlauf zeigten die Metaboliten Pyro-Glutamat und Valin eine kontinuierliche Zunahme über die gesamte Dauer der Messung, wobei Pyro-Glutamat mit einer Konzentrationszunahme von 1,174 mM deutlich stärker erhöht war als Valin mit lediglich 14 μM Überschuss im Vergleich zum Medium. Die Zunahme des Pyro-Glutamins ist auch hier wieder, wie schon bei der Messung ohne Perfusion, auf die spontane Umwandlung aus Glutamin zurückzuführen. Die erhöhte Stoffmenge pro Zeit und Konzentrationsdifferenz im Auffangbehälter von Valin war dagegen überraschend, vor allem da die restlichen untersuchten Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Tyrosin im Vergleich zum Medium eine niedrigere Stoffmenge pro Zeit in der Perfusionskammer zeigten. Im Sammelbehälter konnte dies jedoch nur für Isoleucin und Tyrosin bestätigt werden. Phenylalanin zeigte stattdessen eine geringfügige Konzentrationszunahme um 17 μM , was durch eine geringe pH-Verschiebung im Auffangbehälter und der damit verbundenen Überlappung der Resonanzen verursacht wurde. Es ist also auch im Falle des Phenylalanins mit einer Abnahme im Auffangbehälter zu rechnen.

Zur Untersuchung des Lipidmetabolismus unter normoxischen Bedingungen wurde der Verlauf der Lipidintensitäten in diffusionsgewichteten Spektren untersucht ([Abbildung 4.17](#)). Im Unterschied zur Messung ohne Perfusion war die effektive Diffusionswichtung durch die Perfusion mit 100 $\mu\text{l/min}$ erhöht, wodurch extrazelluläre Metaboliten etwas stärker abgeschwächt wurden.

Eine Analyse der NMR-sichtbaren mobilen Proteinresonanzen war auch im Falle mit Perfusion auf Grund der Überlagerungen mit den mobilen Lipidresonanzen nur durch die Resonanz bei 2,99 ppm (M7) möglich. Die Intensität der mobilen Proteine nahm demnach im Laufe der Messung kontinuierlich um insgesamt ca. 44 % ab ([Abbildung 4.17](#)). Da im Medium kein fötales Kälberserum enthalten war, welches für die Zellproliferation notwendig wäre, war auch keine Proteinsynthese zu erwarten. Die Abnahme der NMR-sichtbaren mobilen Lipide entsprach hier ungefähr der Abnahme der Zellvitalität.

Der Verlauf der mobilen Lipidkonzentrationen zeigte einen deutlichen, nahezu linearen Anstieg der Resonanz der Methylengruppe (ML2) im Laufe der Messung auf das 4,9-fache des Ausgangswertes, die restlichen Lipidresonanzen wiesen eine deutlich geringere Veränderung auf. Dabei blieben ML1 und ML5 nahezu unverändert, während ML3 geringfügig auf das 1,6-fache des Ausgangswerts anstieg und ML4 auf das 0,8-fache absank. Die Überlagerung von ML1, ML4 und ML5 mit Proteinresonanzen, welche im Laufe der Messung abnahmen, resultierte in dem konstanten Verhalten von ML1 und ML5 sowie dem geringfügigen Abfall von ML4. Bei ML4 spielte für das abnehmende Verhalten zusätzlich auch die Überlagerung mit extrazellulärem Pyro-Glutamat und Glutamin eine Rolle. Die Resonanz der Methingruppe

(ML6) war nahe des Detektionsminimums und zeigte tendenziell einen ähnlichen Verlauf wie ML2. Auf Grund der Nähe zum Rauschen war der Verlauf allerdings durch starke Schwankungen geprägt. Insgesamt deutet die Zunahme der Resonanzen der Methylen- und Methingruppe auf eine kontinuierliche Abnahme der Zellvitalität hin. Unterstützt wird diese Annahme durch den ebenfalls kontinuierlichen Anstieg des gemessenen Sauerstoffgehalts in der Ableitung der Perfusionskammer, welcher für eine stetige Abnahme des Sauerstoffverbrauchs über die gesamte Messung steht.

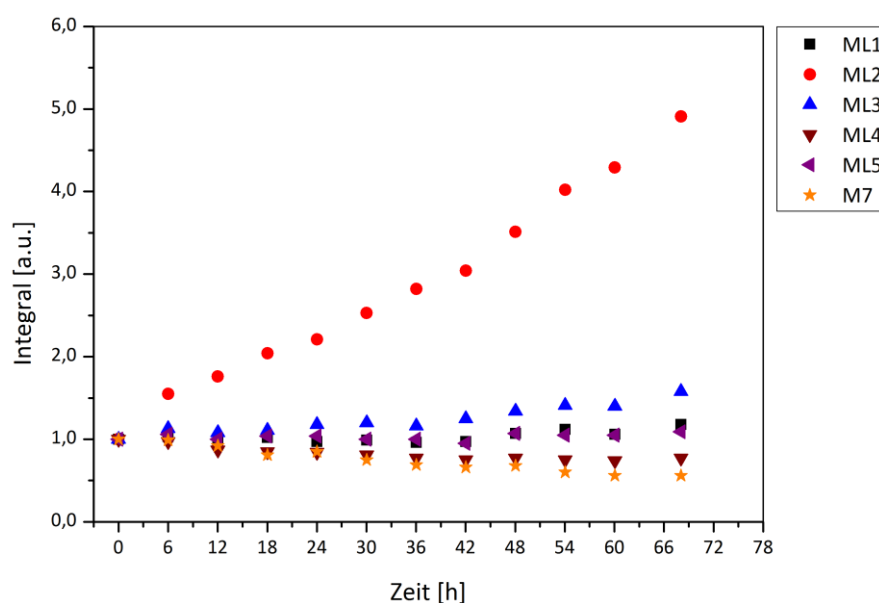


Abbildung 4.17 Verlauf der Integrale der NMR-sichtbaren mobilen Lipide und Proteine der Zelllinie HTZ-349 unter Perfusion, bei normoxischen Bedingungen. Dargestellt sind die Integrale der mobilen Lipide (ML1 - ML5) und der Proteinresonanz M7 in 6 Stunden Intervallen. Die Integrale wurden zur besseren Vergleichbarkeit jeweils auf den Ausgangswert normiert. Grundlage für die Abbildung waren diffusionsgewichtete ^1H -Spektren bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. ML1 ist die Resonanz von Methylgruppen, ML2 ist die Resonanz von Methylengruppen, ML3 und ML5 sind Resonanzen von gesättigten Fettsäuren und ML4 sowie ML6 sind Resonanzen von ungesättigten Fettsäuren. M7 ist die einzige nicht von mobilen Lipiden überlagerte Proteinresonanz bei 2,99 ppm. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: b -Wert = $7,4 \cdot 10^9 \text{ s}/\text{m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = $0,51 \text{ T}/\text{m}$. Der Gradient wurde so gewählt, dass die niedermolekularen Anteile abgeschwächt wurden. ML6 wurde hier nicht dargestellt, da diese Resonanz dem Detektionsminimum sehr nahe war und daher starken Schwankungen unterworfen war.

Tabelle 4.13 zeigt den Verlauf der Verhältnisse der mobilen Lipide im Vergleich zur Methylengruppe (ML2). Dabei zeigten alle Lipide bis auf die Methingruppe (ML6) eine Abnahme im Laufe der Messung. Auch wenn die Methingruppe nahe dem Detektionsminimum war glich der Anstieg der ML6 Resonanz ungefähr dem Anstieg der Methylengruppe. Die anderen Lipidresonanzen ML1, ML3, ML4 und ML5 zeigten im Vergleich zur Methylengruppe einen Abfall im Laufe der Zeit, welcher in allen Fällen gleichartig verlief und dem Anstieg der Methylengruppe geschuldet ist. ML1, ML4 und ML5 wiesen dabei zu Beginn erhöhte Verhältnisse auf, welche auf Überlagerungen mit den mobilen Proteinresonanzen und den hochkonzentrierten extrazellulären Metaboliten zurückzuführen waren.

Tabelle 4.13 Verlauf der Verhältnisse der mobilen Lipide der Zelllinie HTZ-349 in Relation zu ML2 unter Perfusion, bei normoxischen Bedingungen. Für die Verhältnisse zu ML2 wurden diffusionsgewichtete ^1H -Spektren bei 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ in einem Intervall von 6 Stunden verwendet. ML1 ist die Resonanz von Methylgruppen, ML2 ist die Resonanz von Methylengruppen, ML3 und ML5 sind Resonanzen von gesättigten Fettsäuren und ML4 sowie ML6 sind Resonanzen von ungesättigten Fettsäuren. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: $b\text{-Wert} = 7,4 \cdot 10^9 \text{ s}/\text{m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = 0,51 T/m. ML6 war nahe dem Detektionsminimum und damit starken Schwankungen unterworfen.

Zeit [h]	ML6	ML5	ML4	ML3	ML2	ML1
0	0,06	0,85	2,45	0,47	1,00	1,21
6	0,09	0,58	1,53	0,35	1,00	0,81
12	0,10	0,48	1,21	0,29	1,00	0,66
18	0,06	0,43	1,03	0,26	1,00	0,60
24	0,12	0,40	0,93	0,25	1,00	0,53
30	0,06	0,33	0,78	0,22	1,00	0,47
36	0,09	0,30	0,67	0,20	1,00	0,41
42	0,08	0,26	0,60	0,20	1,00	0,39
48	0,07	0,26	0,54	0,18	1,00	0,37
54	0,08	0,22	0,46	0,17	1,00	0,34
60	0,07	0,21	0,43	0,15	1,00	0,30
68	0,07	0,19	0,38	0,15	1,00	0,29

Insgesamt zeigte die Perfusionsmessung der humanen Glioblastom-Zellen eine deutliche Verbesserung der Bedingungen für die Zellen im Vergleich zur Situation ohne Perfusion. Die kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, der Abtransport der metabolischen Abfallprodukte und die Gewährleistung eines physiologischen pH-Werts ermöglichten es die Zellvitalität von 6 %, im Falle ohne Perfusion, auf 55 %, nach fast drei Tagen, zu erhöhen. In Zellkulturflaschen konnte ohne fötalem Kälberserum mit der gleichen Zellzahl nach 72 Stunden nur ein mittlerer Anteil an lebenden Zellen von 10 % erreicht werden, was klar für das Perfusions-System spricht. Die kontinuierliche nahezu lineare Abnahme des Sauerstoffverbrauchs und der NMR-sichtbaren mobilen Proteinresonanzen sowie die lineare Zunahme der Methylenresonanz der mobilen Lipide spricht zudem für eine gleichmäßige Abnahme der Zellvitalität unter normoxischen Bedingungen.

4.3.3 HTZ-349 unter Perfusion bei hypoxischen Bedingungen

Zur metabolischen Untersuchung von humanen Glioblastom-Zellen unter hypoxischen Bedingungen wurde der Sauerstoffgehalt in der Perfusionskammer auf das technisch mögliche Minimum reduziert. Dieses lag, dank Verwendung von Edelstahl-Kapillarrohren und Viton-Schläuchen, trotz der großen Länge der Zuleitung und der geringen Perfusionsrate bei $0,5 \pm 1,0 \text{ \% O}_2$ in der Zuleitung zur Perfusionskammer. Da die Perfusionskammer mit den Zellen an das bereits mit Medium befüllte Perfusions-System angeschlossen werden musste und das

Erreichen hypoxischer Konzentrationen im Inkubator knapp über 11 Stunden dauerte, konnten die Zellen nicht von Beginn an unter Hypoxie untersucht werden. Außerdem zeigten kurze hypoxische Phasen unter 10 Stunden keine detektierbaren metabolischen Auswirkungen. Daher wurden die im 0,5%igen Agarosefaden eingebetteten 6 Millionen Zellen der Zelllinie HTZ-349 für die ersten 25 Stunden unter normoxischen Bedingungen gehalten. Dazu wurde das Medium mit 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ und bei einer Begasung mit 21,0 % O_2 durch die Perfusionskammer gepumpt. Im Anschluss an diese Phase wurde die Begasung mit Sauerstoff eingestellt. Im Inkubator wurde durch Zuleitung von Stickstoff in einer Zeit von ca. 11 Stunden der restliche Sauerstoff vollständig aus dem Innenraum verdrängt, während die Begasung mit Kohlendioxid weiter stattfand. Dann folgte eine 22-stündige hypoxische Phase, in deren Anschluss der Sauerstoffgehalt in ca. 6 Stunden wieder auf normoxische Werte erhöht wurde. Weitere 8 Stunden unter normoxischen Bedingungen später wurde die Messung nach insgesamt 72 Stunden beendet (Abbildung 4.18).

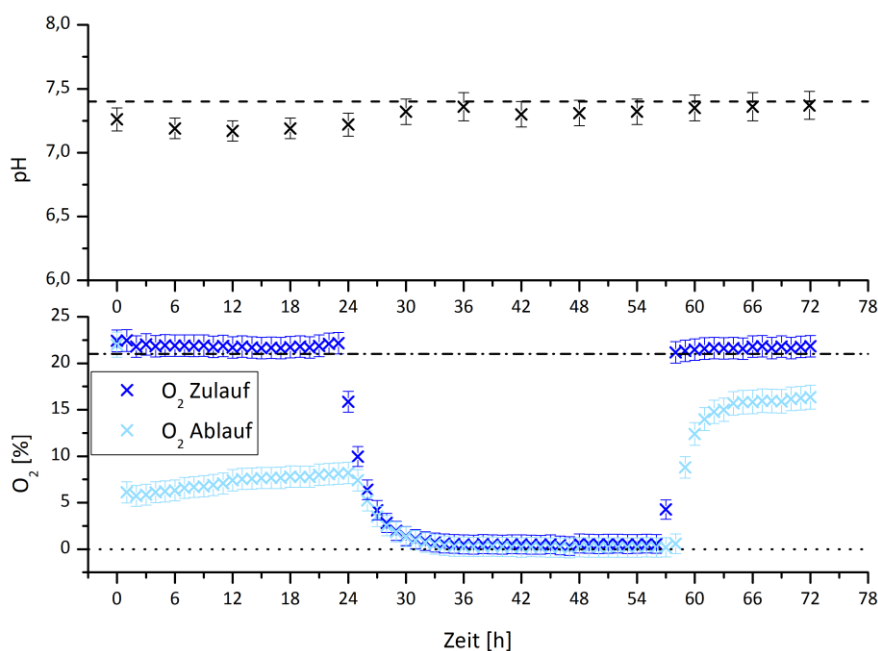


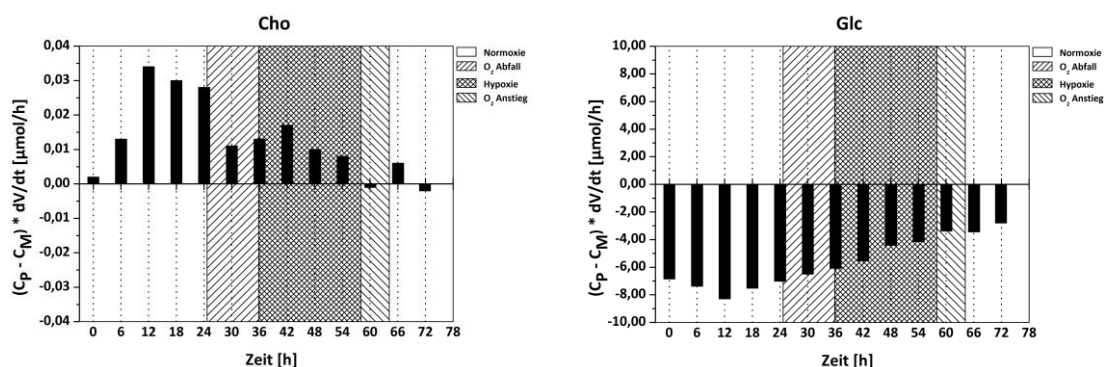
Abbildung 4.18 Verlauf des pH-Wertes in der Perfusionskammer und des Sauerstoffgehaltes im Zu- und Ablauf der Perfusionskammer bei 6 Millionen HTZ-349 unter Perfusion über 72 Stunden, bei einer 22-stündigen hypoxischen Phase. **Oben:** Die Einstellung des physiologischen pH-Wertes von 7,4 pH (gestrichelte Linie) erfolgte durch Begasung des Mediums mit 6,5 % CO_2 . Die chemische Verschiebung der H^{e1} -Resonanz des Histidins wurde durch 1D ^1H -NOESY-Spektren bestimmt und in die entsprechenden pH-Werte umgerechnet. **Unten:** Der Sauerstoffgehalt im Zulauf (dunkelblau) wurde während der normoxischen Phase durch die Begasung des Mediums mit 21 % O_2 (strichpunktierte Linie) eingestellt. In der hypoxischen Phase wurde das Medium nur mit Stickstoff und Kohlendioxid begast, wodurch der Sauerstoffgehalt auf 0,0 % fiel (gepunktete Linie). Der reduzierte Sauerstoffgehalt im Ablauf (hellblau) resultierte aus dem Verbrauch der Zellen und aus der hypoxischen Phase. Die dargestellten Sauerstoffwerte wurden bei Raumtemperatur gemessen und auf 37 °C zurückgerechnet. Die Messung in der Perfusionskammer fand bei 37 °C, einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ und einer Resonanzfrequenz von 800 MHz statt. Für die Darstellung wurde ein Messintervall von 6 Stunden für den pH-Verlauf und ein Messintervall von einer Stunde für den Sauerstoffverlauf gewählt.

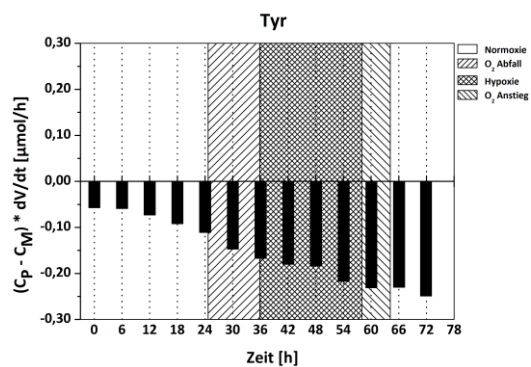
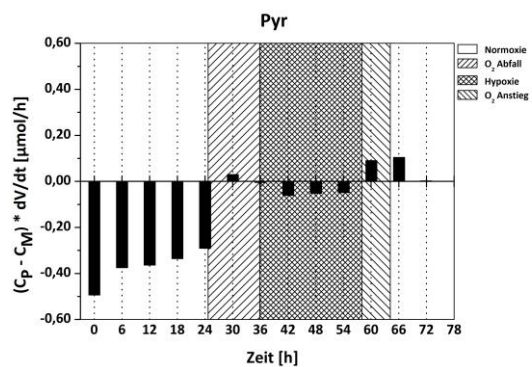
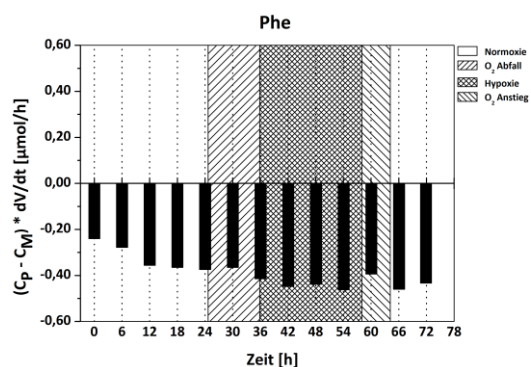
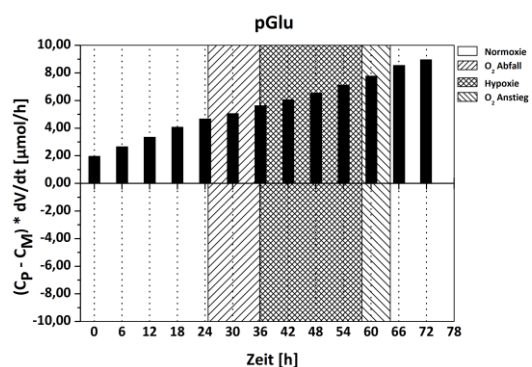
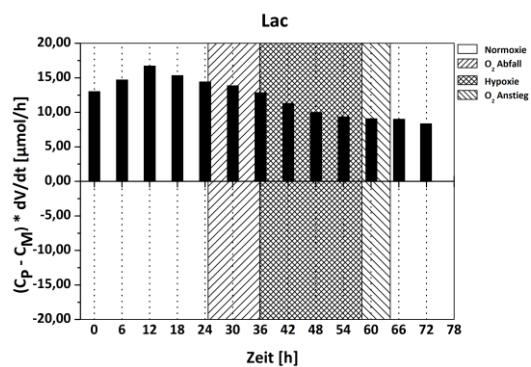
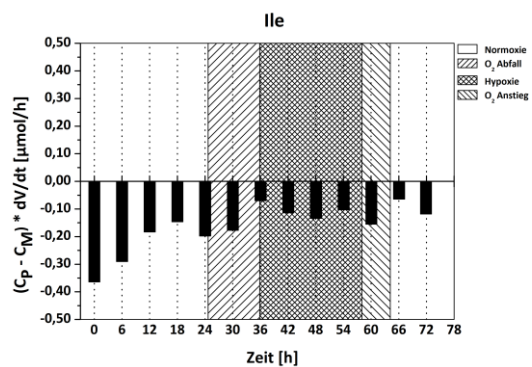
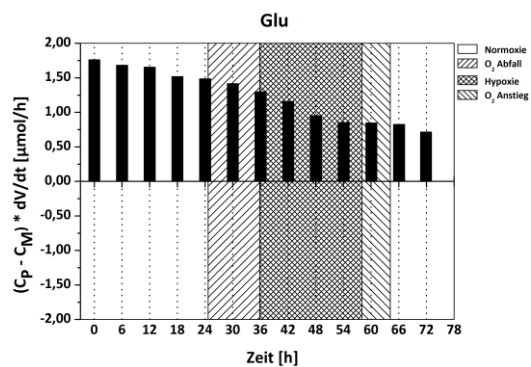
Im Zulauf der Perfusionskammer ergab sich in den normoxischen Phasen ein mittlerer Sauerstoffgehalt von $21,8 \pm 1,2 \%$ und während der Hypoxie wurden im Mittel $0,5 \pm 1,0 \%$ O_2 gemessen. Im Ablauf der Perfusionskammer wurde im ersten normoxischen Abschnitt nach einer kurzen Einschwingzeit ein Ausgangswert von $5,7 \pm 1,1 \%$ O_2 und in der zweiten normoxischen Phase, nach 72 Stunden, ein Wert von $16,3 \pm 1,3 \%$ O_2 gemessen. Der Sauerstoffverbrauch nahm damit über die gesamte Messung um $10,6 \%$ O_2 ab. In der hypoxischen Phase konnte im Ablauf der Perfusionskammer ein mittlerer Sauerstoffgehalt von $0,2 \pm 1,0 \%$ detektiert werden.

Zur Einstellung eines physiologischen pH-Wertes wurde das Medium mit CO_2 begast. Auf Grund einer erhöhten metabolischen Aktivität der verwendeten Zellen reichten die üblichen $8,7 \%$ CO_2 hier nicht aus, wodurch der pH-Wert in den ersten 24 Stunden etwas zu niedrig war. Durch Regulierung der CO_2 -Begasung auf $6,5 \%$ konnte der pH-Wert wieder auf $7,4$ pH gestellt werden. Insgesamt lag der pH-Wert im Mittel bei $7,29 \pm 0,10$ pH. Die Zellvitalität wurde durch die lange hypoxische Phase beeinflusst und lag nach Beendigung der Messung bei einem Anteil an lebenden Zellen von 43% .

Die metabolische Auswertung ergab wie erwartet, dass der Verbrauch der Metaboliten Glutamin, Glukose und Pyruvat am größten war ([Abbildung 4.19](#)). In den ca. 432 ml Medium, welche über 72 Stunden durch das System gepumpt wurden, konnte insgesamt ein Minus von $0,866$ mM Glutamin, $0,371$ mM Glukose und 72 μ M Pyruvat im Vergleich zum Medium nachgewiesen werden ([Tabelle 4.14](#)).

Glutamin zeigte zu Beginn eine um 3% niedrigere Stoffmenge pro Zeit als im Medium und der Anteil stieg während der Messung kontinuierlich auf 22% . Eine Beeinflussung des Glutamin-Verbrauchs durch die hypoxische Phase konnte nicht festgestellt werden. Das spricht für die experimentellen Ergebnisse, bei denen eine Beteiligung der Zellen bei der Umwandlung von Glutamin zu Pyro-Glutamat ausgeschlossen werden konnte. Pyro-Glutamat spiegelte den Verlauf von Glutamin und zeigte eine kontinuierliche Zunahme bis zum Ende der Messung. Im Sammelbehälter konnte insgesamt eine Konzentrationszunahme um $1,023$ mM ermittelt werden. Die Zunahme der Konzentration des Pyro-Glutamats im Auffangbehälter lag damit höher als die Abnahme der Glutamin-Konzentration ($0,866$ mM). Dies lag hier an einer Überlagerung des Pyro-Glutamats mit einer unbekannten Resonanz im Spektrum.





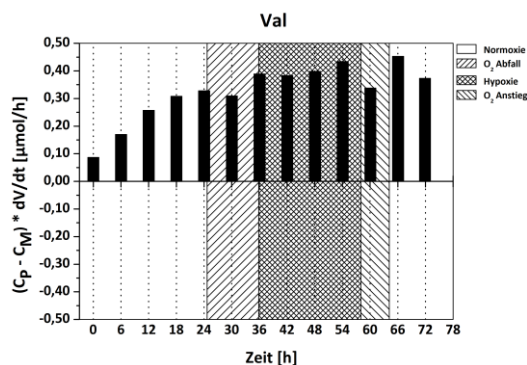


Abbildung 4.19 Zeitlicher Verlauf der Stoffmenge pro Zeit ausgewählter Metaboliten von 6 Millionen HTZ-349 unter Perfusion, bei einer 22-stündigen hypoxischen Phase. Gezeigt ist die Differenz der Konzentration der Metaboliten in der Perfusionskammer (C_p) mit der im Medium enthaltenen Konzentration (C_m) multipliziert mit der eingestellten Perfusionsrate (dV/dt) von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ in 6 Stunden Intervallen. Die einfach schraffierten Flächen markieren zeitliche Bereiche, in denen der Sauerstoffgehalt im Ablauf der Perfusionskammer ab- (links) oder zunahm (rechts). Der kreuzschraffierte Bereich markiert den hypoxischen Bereich, in dem Sauerstoffgehalt bei $\leq 0,2\%$ lag. Die Konzentrationen wurden aus 1D ^1H -NOESY-Spektren (11 min Aufnahmezeit, 64 Scans) unter Perfusion, bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz und einer Temperatur von 37 °C über den NMR-Standard DSS bestimmt, dessen Konzentration im Perfusionsmedium 50 μM betrug.

Der Glukose-Verlauf startete mit einem im Vergleich zum Medium um 22 % reduzierten Wert. Dieser Verbrauch stieg die ersten 12 Stunden auf einen maximalen Anteil von 27 % und sank dann bis zum Ende auf 9%. Nach 48 Stunden – während der Hypoxie – war ein sprunghafter Rückgang der Glukose-Konzentration erkennbar, welcher ungefähr dem Doppelten der durchschnittlichen Abnahme entsprach.

Zu Beginn der Messung waren 7 % weniger Pyruvat in der Perfusionskammer, als im Medium normalerweise vorhanden waren. Dieser Verbrauch nahm während der ersten normoxischen Phase stetig ab und endete abrupt mit der Abnahme des Sauerstoffgehaltes im Medium ab 24 Stunden. Danach pendelte die gemessene Pyruvat-Stoffmenge pro Zeit zwischen einer geringfügigen Abnahme und einer minimalen Erhöhung im Vergleich zum Medium.

Die Laktat-Synthese spiegelte den Verlauf von Glukose wider, d.h. die Synthese erreichte nach 12 Stunden ihr Maximum und fiel dann wieder ab. Zu Beginn der hypoxischen Phase war dieser Abfall beschleunigt, während gegen Ende dieses Abschnitts die Laktat-Produktion ein konstantes Niveau erreichte. Auch hier war, wie bei Glukose, ein Sprung während der hypoxischen Phase aufgetreten, bei dem die Abnahme ungefähr doppelt so groß war wie der mittlere Abfall. Im Sammelbehälter konnten in den ca. 432 ml Medium nach Beendigung der Messung insgesamt 1,410 mM Laktat nachgewiesen werden.

Der Glutamat-Verlauf zeigte im Vergleich zum Medium ebenfalls erhöhte Werte, welche allerdings im Laufe der Messung abnahmen. Wie bei Laktat war diese Abnahme zu Beginn der Hypoxie beschleunigt. Gegen Ende dieser Phase blieb die Stoffmenge pro Zeit des Glutamats nahezu konstant. Im Medium konnte ein Plus von 28 μM bestimmt werden.

Die gemessene Stoffmenge pro Zeit des Cholins zeigte praktisch keine Änderung zum im Medium enthaltenen Anteil. Im Mittel betrug die Abweichung zum Medium lediglich 0,013 $\mu\text{mol/h}$. Erhöhte Werte waren vor allem in der normoxischen Phase zu verzeichnen. Während des Sauerstoffmangels waren die Cholin-Werte tendenziell erniedrigt. Im

Sammelbehälter konnte auch keine Veränderung der Konzentration im Vergleich zum Medium festgestellt werden ($-1 \mu\text{M}$).

Phenylalanin und Tyrosin zeigten eine mit der Zeit abnehmende Stoffmenge pro Zeit im Vergleich zum Medium, im Sammelbehälter konnte jedoch bei beiden Metaboliten praktisch keine Konzentrationsänderung nachgewiesen werden. Eine Beeinflussung durch die Hypoxie war auch nicht erkennbar. Bei Phenylalanin war vor und nach der Hypoxie ein verminderter Verbrauch zu beobachten. Dieser wurde allerdings durch eine Änderung des pH-Wertes auf Grund von Schwankungen der CO_2 -Begasung und damit verbundenen Überlagerungen hervorgerufen.

Die Stoffmenge pro Zeit der Aminosäure Isoleucin zeigte im Vergleich zum Medium ebenfalls eine Abnahme mit der Zeit, welche während der hypoxischen Phase etwas deutlicher reduziert war. Im Sammelbehälter wurde nach der Messung ein Verbrauch von $28 \mu\text{M}$ nachgewiesen.

Die Aminosäure Valin zeigte eine Zunahme der Stoffmenge pro Zeit über die gesamte Messung. Im Medium aus dem Auffangbehälter konnte hier eine Konzentrationszunahme von $54 \mu\text{M}$ im Vergleich zum Medium nachgewiesen werden. Eine Beeinflussung durch die hypoxische Phase war nicht zu erkennen. Die niedrigeren Stoffmengen pro Zeit bei der Änderung des Sauerstoffgehaltes waren wie bei Phenylalanin auf geringfügige pH-Änderungen wegen Veränderungen der CO_2 -Begasung zurückzuführen.

Tabelle 4.14 Stoffmenge pro Zeit und Konzentrationen der untersuchten Metaboliten der Zelllinie HTZ-349 unter Perfusion, bei einer 22-stündigen hypoxischen Phase. Die Multiplikation der Konzentration der Metaboliten im Medium (C_M) mit der verwendeten Perfusionsrate (dV/dt) von $100 \mu\text{l}/\text{min}$ beschreibt die Stoffmenge pro Zeit, welche in der Perfusionskammer ohne Zellen gemessen werden würde. C_P^S ist die tatsächlich gemessene Konzentration der Metaboliten in der Perfusionskammer mit Zellen zu Beginn und C_P^E die Konzentration am Ende der Messung. $C_P^S \cdot dV/dt$ und $C_P^E \cdot dV/dt$ beschreiben dementsprechend die gemessene Stoffmenge pro Zeit in der Perfusionskammer mit Zellen zu Beginn und am Ende der Messung nach 72 Stunden. Die Konzentrationen C_P enthalten sowohl intra- als auch extrazelluläre Anteile. Die Variable C_A ist die Konzentration der Metaboliten im Auffangbehälter nach der Messung. Da C_A nur extrazelluläre Metaboliten enthält, beschreibt die Differenz $C_A - C_M$ die Synthese bzw. den Verbrauch des jeweiligen Metaboliten über die gesamte Messdauer. Für die Bestimmung der Konzentrationen wurden 1D ^1H -NOESY-Spektren unter Perfusion, bei 37°C und 800 MHz Resonanzfrequenz aufgezeichnet.

Metabolit	$C_M \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	$C_P^S \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	$C_P^E \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	C_M [mM]	C_A [mM]	$C_A - C_M$ [mM]
Cho	0,198	0,198	0,198	0,033	0,032	- 0,001
Glc	30,798	23,952	27,996	5,133	4,762	- 0,371
Gln	33,270	32,106	25,986	5,545	4,679	- 0,866
Glu	0,552	2,316	1,266	0,092	0,120	+ 0,028
Ile	4,440	4,074	4,320	0,740	0,712	- 0,028
Lac	0,000	13,002	8,334	0,000	1,410	+ 1,410
pGlu	7,626	9,582	16,578	1,271	2,294	+ 1,023
Phe	2,214	1,974	1,782	0,369	0,372	+ 0,003
Pyr	6,930	6,438	6,930	1,155	1,083	- 0,072
Tyr	2,190	2,130	1,944	0,365	0,367	+ 0,002
Val	4,452	4,542	4,824	0,742	0,776	+ 0,034

Eine metabolische Auswertung der NMR-sichtbaren mobilen Proteine war wie bei den vorherigen Messungen auf Grund von Überlagerungen nur bei der Resonanz M7 (2,99 ppm) möglich ([Abbildung 4.20](#)). Diese zeigte zu Beginn eine geringfügige Abnahme, welche sich ab ca. 18 Stunden verstärkte. Bei 30 Stunden, im Bereich des abnehmenden Sauerstoffgehaltes, zeigte sich ein größerer Sprung in der Abnahme (-13 %). Anschließend fiel der Proteingehalt gleichmäßig weiter und zeigte gegen Ende im normoxischen Bereich eine leichte Zunahme des Gehalts um ca. 8 %. Insgesamt war die Konzentration der Proteinresonanz M7 im Laufe der Messung um etwa 50 % gesunken. Der Sprung während des abnehmenden Sauerstoffgehalts spricht für einen verstärkten Proteinabbau und einer damit verbundenen Zunahme der Apoptose.

Die Analyse des Lipidmetabolismus zeigte einen übereinstimmenden Verlauf der Integrale in den diffusionsgewichteten Spektren für alle Lipidresonanzen ([Abbildung 4.20](#)). Während der normoxischen Phase in den ersten 24 Stunden stieg die Konzentration aller mobilen Lipide an. Während der anschließenden Phase, in welcher der Sauerstoffgehalt gesenkt wurde, zeigten vor allem die Methylengruppe (ML2) und die Methingruppe (ML6) einen stärkeren Anstieg, welcher dann für alle Lipide während der Hypoxie abflachte. ML2 erreichte gegen Ende der hypoxischen Phase dabei das 27-fache, während ML6 ungefähr das 13-fache des Ausgangswertes erreichte. Die restlichen Lipide waren mit Werten zwischen dem 1,5 - 5,4-fachen des Ausgangswertes am Ende der hypoxischen Phase deutlich weniger erhöht. In den anschließenden Phasen des zunehmenden Sauerstoffgehalts und der Normoxie war für die meisten Lipidresonanzen praktisch keine Veränderung mehr festzustellen, lediglich ML6 zeigte eine geringfügige Abnahme gegen Ende der Messung nach 72 Stunden. Die Resonanz ML4 zeigte wieder die geringste Veränderung über die gesamte Messung.

Der verstärkte Anstieg der ML2- und ML6-Resonanzen während der Sauerstoffabnahme spricht für eine Zunahme der Apoptose in dieser Phase. Bekräftigt wird dies durch den erhöhten Proteinabbau in diesem Zeitabschnitt. Das Abflachen des Anstiegs der mobilen Lipide spricht für eine Verlangsamung der Rate mit der die Zellen apoptotisch wurden. Der Verlauf der Laktat-Synthese bestätigt dies, denn die ermittelte Stoffmenge pro Zeit in der Perfusionskammer nahm ab 42 Stunden weniger stark ab.

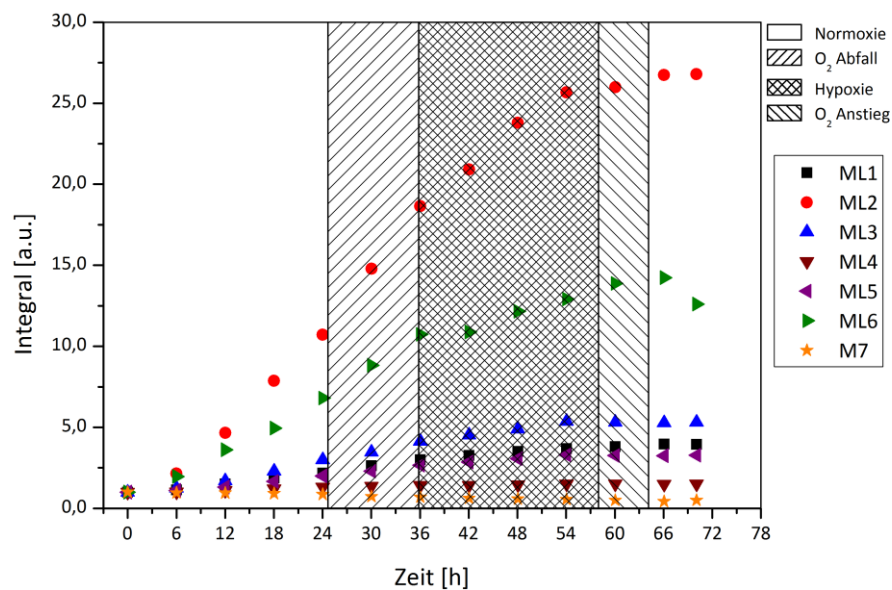


Abbildung 4.20 Verlauf der Integrale der NMR-sichtbaren mobilen Lipide und Proteine der Zelllinie HTZ-349 unter Perfusion, bei einer 22-stündigen hypoxischen Phase. Dargestellt sind die Integrale der mobilen Lipide (ML1 - ML6) und der Proteinresonanz M7 in 6 Stunden Intervallen. Die Integrale wurden zur besseren Vergleichbarkeit jeweils auf den Ausgangswert normiert. Die einfach schraffierten Flächen markieren zeitliche Bereiche, in denen der Sauerstoffgehalt im Ablauf der Perfusionskammer ab- (links) oder zunahm (rechts). Der kreuzschraffierte Bereich markiert den hypoxischen Bereich, in dem Sauerstoffgehalt bei $\leq 0,2\%$ lag. Grundlage für die Abbildung waren diffusionsgewichtete ^1H -Spektren bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37°C und einer Perfusionsrate von $100\ \mu\text{l}/\text{min}$. ML1 ist die Resonanz von Methylgruppen, ML2 ist die Resonanz von Methylengruppen, ML3 und ML5 sind Resonanzen von gesättigten Fettsäuren und ML4 sowie ML6 sind Resonanzen von ungesättigten Fettsäuren. M7 ist die einzige nicht von mobilen Lipiden überlagerte Proteinresonanz bei 2,99 ppm. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: $b\text{-Wert} = 7,4 \cdot 10^9\ \text{s}/\text{m}^2$, $\Delta = 100\ \text{ms}$, $\delta = 2\ \text{ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = $0,51\ \text{T}/\text{m}$. Der Gradient wurde so gewählt, dass die niedermolekularen Anteile abgeschwächt wurden.

Die Überlagerung der mobilen Lipidresonanzen mit den Proteinresonanzen spielte hier nur zu Beginn eine Rolle, da die Lipide sehr stark in ihrer Intensität zunahmen und die mobilen Proteine im Laufe der Messung im Mittel um etwa 50 % ihrer Intensität abnahmen. In [Tabelle 4.15](#) sind aus diesem Grund und der Überlagerung mit dem hoch konzentrierten extrazellulären Glutamin und Pyro-Glutamat zu Beginn erhöhte Werte für ML1, ML4 und ML5 im Verhältnis zu ML2 zu beobachten. Der Vergleich aller Lipidresonanzen mit der Methylengruppe zeigte ein vergleichbares Verhalten für alle Lipide. Nach einem anfänglichen Abfall der Verhältnisse blieben die Werte ab dem Erreichen der Hypoxie konstant, d.h. die Entwicklung aller Lipidkonzentrationen war ab der hypoxischen Phase für alle mobilen Lipide identisch. Demnach glich die Methingruppe in ihrem Verlauf eher dem Verhalten der Lipide ML1, ML3, ML4 und ML5 und nicht, wie bei normoxischer Bedingung, dem der Methylengruppe.

Tabelle 4.15 Verlauf der Verhältnisse der mobilen Lipide der Zelllinie HTZ-349 in Relation zu ML2 unter Perfusion, bei einer 22-stündigen hypoxischen Phase. Für die Verhältnisse zu ML2 wurden diffusionsgewichtete ^1H -Spektren bei 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ in einem Intervall von 6 Stunden verwendet. ML1 ist die Resonanz von Methylgruppen, ML2 ist die Resonanz von Methylengruppen, ML3 und ML5 sind Resonanzen von gesättigten Fettsäuren und ML4 sowie ML6 sind Resonanzen von ungesättigten Fettsäuren. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: $b\text{-Wert} = 7,4 \cdot 10^9 \text{ s}/\text{m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = 0,51 T/m.

Zeit	ML6	ML5	ML4	ML3	ML2	ML1
0	0,13	0,96	3,02	0,56	1,00	1,38
6	0,12	0,50	1,43	0,33	1,00	0,74
12	0,10	0,27	0,72	0,20	1,00	0,45
18	0,08	0,20	0,46	0,16	1,00	0,33
24	0,08	0,18	0,37	0,16	1,00	0,28
30	0,07	0,15	0,28	0,13	1,00	0,25
36	0,07	0,14	0,23	0,12	1,00	0,22
42	0,07	0,13	0,21	0,12	1,00	0,22
48	0,06	0,12	0,18	0,12	1,00	0,20
54	0,06	0,12	0,18	0,12	1,00	0,20
60	0,07	0,12	0,18	0,11	1,00	0,20
66	0,07	0,12	0,17	0,11	1,00	0,21
70	0,06	0,12	0,17	0,11	1,00	0,20

Die hier verwendeten Glioblastom-Zellen der Zelllinie HTZ-349 waren zu Beginn der Messung stark metabolisch aktiv. Dies zeigte sich in dem für Tumorzellen ungewöhnlich hohen anfänglichen Sauerstoffverbrauch von 15,3 % O_2 . Zudem waren die ermittelten Stoffmengen pro Zeit im Vergleich zur Messung unter Normoxie in Kapitel 4.3.2 von Glukose und Pyruvat deutlich verringert sowie die von Laktat stark erhöht. Diese verstärkte glykolytische Aktivität erreichte ihr Maximum nach 12 Stunden, wie die Stoffmengenverläufe von Glukose und Laktat zeigten. Danach nahm die Aktivität bereits während der normoxischen Phase wieder ab. Durch die gasdichte Konstruktion des Perfusions-Systems war es möglich eine 22-stündige hypoxische Phase aufrecht zu erhalten, während dieser der Sauerstoffgehalt in der Zuleitung der Perfusionskammer auf $0,5 \pm 1,0 \text{ \% O}_2$ gesenkt werden konnte. In dieser hypoxischen Phase zeigte sich ein weiterer Rückgang der Glykolyse, aber aus dem Verlauf aller Metaboliten und der mobilen Lipide ließ sich schließen, dass im Laufe der hypoxischen Phase immer weniger Zellen apoptotisch wurden. Gegen Ende der Messung nach 72 Stunden waren noch 43 % der Zellen am Leben und der Sauerstoffverbrauch war auf 4,7 % O_2 gesunken. Dementsprechend war die Sauerstoffverbrauchsrate von anfänglichen $2,8 \text{ \% O}_2 / 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen}$ auf $1,8 \text{ \% O}_2 / 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen}$ beziehungsweise von $28,1 \mu\text{mol O}_2 / (\text{l} \cdot 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen})$ auf $18,1 \mu\text{mol O}_2 / (\text{l} \cdot 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen})$ gesunken. Die Zellen hatten sich also an die Umgebungsbedingungen metabolisch angepasst.

4.3.4 HTZ-349 unter Perfusion bei Variation des pH-Wertes

Zur Analyse der Auswirkung einer Änderung des pH-Wertes auf den Metabolismus der humanen Glioblastom Zelllinie HTZ-349 wurden 6 Millionen Zellen, eingebettet in einen 0,5%igen Agarosefaden, abwechselnd in saurer und physiologischer Umgebung unter Perfusion mit 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ untersucht. Die Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich wurde gewählt, da *in vivo* der pH-Wert auf Grund erhöhter Laktatkonzentrationen ebenfalls zu niedrigeren pH-Werten verschoben ist [Kahlert et al. 2017]. In der ersten Phase wurde der pH-Wert durch entsprechende Begasung mit CO_2 auf im Mittel $6,76 \pm 0,05$ pH eingestellt. Nach 24 Stunden folgte dann eine physiologische Phase mit einem mittleren pH-Wert von $7,30 \pm 0,10$ pH und nach 48 Stunden bis zum Ende der Messung nach insgesamt 70 Stunden folgte eine zweite saure Phase mit einem durchschnittlichen pH-Wert von $6,87 \pm 0,05$ pH in der Perfusionskammer ([Abbildung 4.21](#)).

Die Sauerstoffkonzentration im Medium wurde konstant bei 21 % O_2 gehalten. Im Mittel ergab sich im Zulauf zur Perfusionskammer ein auf 37 °C zurückgerechneter Sauergehalt von $21,9 \pm 1,2$ % O_2 . Im Ablauf ergab sich nach einer anfänglichen Einschwingphase eine Startkonzentration von $15,0 \pm 1,3$ % O_2 , welche über die Messung anstieg und bei einer Konzentration von $18,1 \pm 1,3$ % O_2 endete. Die Analyse des Sauerstoffverbrauchs nach Einteilung in die unterschiedlichen pH-Phasen unter Berücksichtigung der Zeit, die das Medium benötigt in die Perfusionskammer zu gelangen und den pH-Wert dort zu ändern (ca. 3 Stunden), ergab eine deutliche Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs. So konnte in der ersten Phase bei saurem pH-Wert eine Zunahme des Sauerstoffgehaltes im Medium um 1,3 % O_2 festgestellt werden. In der physiologischen Phase nahm der Sauerstoffgehalt insgesamt nur um 0,7 % O_2 zu. Dabei blieb der Sauerstoffgehalt in den letzten 15 Stunden dieser Phase praktisch konstant (+ 0,1 % O_2). In der zweiten sauren Phase erhöhte sich der Sauerstoffgehalt im Medium wieder und nahm um 1,1 % O_2 zu. Die Änderung in dieser Phase trat dabei sehr schnell zwischen 54 und 55 Stunden Gesamtmesszeit auf. Insgesamt reduzierte sich der Sauerstoffverbrauch somit über die Messdauer von 70 Stunden um 3,1 % O_2 . In der Zeit von 1 - 22 Stunden konnte der Sauerstoffgehalt im Zulauf auf Grund einer technischen Störung nicht aufgezeichnet werden. Da die Begasung des Mediums in dieser Zeit nicht verändert wurde, kann aber davon ausgegangen werden, dass sich die Sauerstoffkonzentration im Medium während dieser Zeit nicht verändert hatte. Die Überprüfung der Zellvitalität mit Trypanblau nach Beendigung der Messung ergab eine deutliche Beeinflussung durch die Phasen mit saurem pH-Wert. Der Anteil an lebenden Zellen sank auf 18 %.

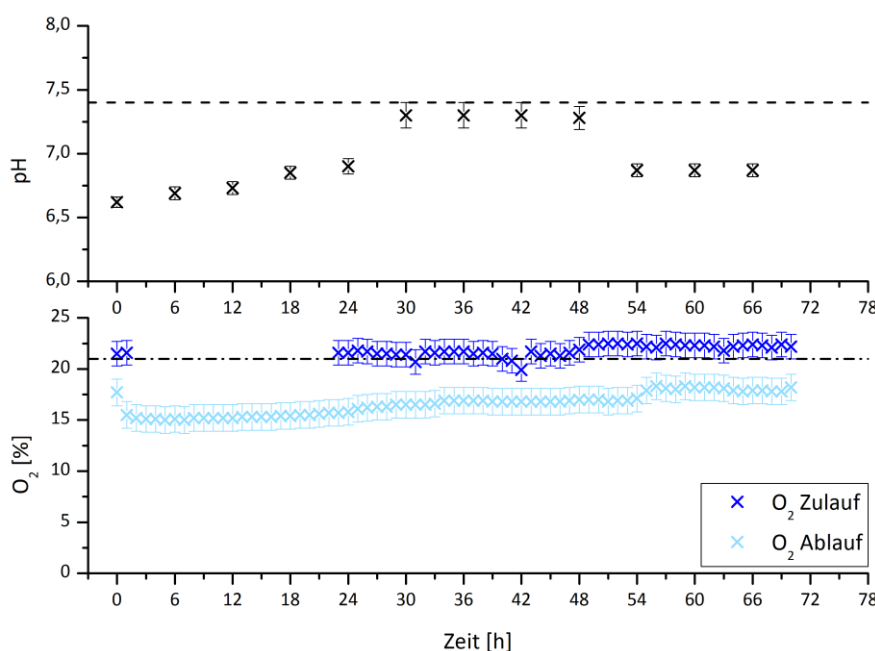


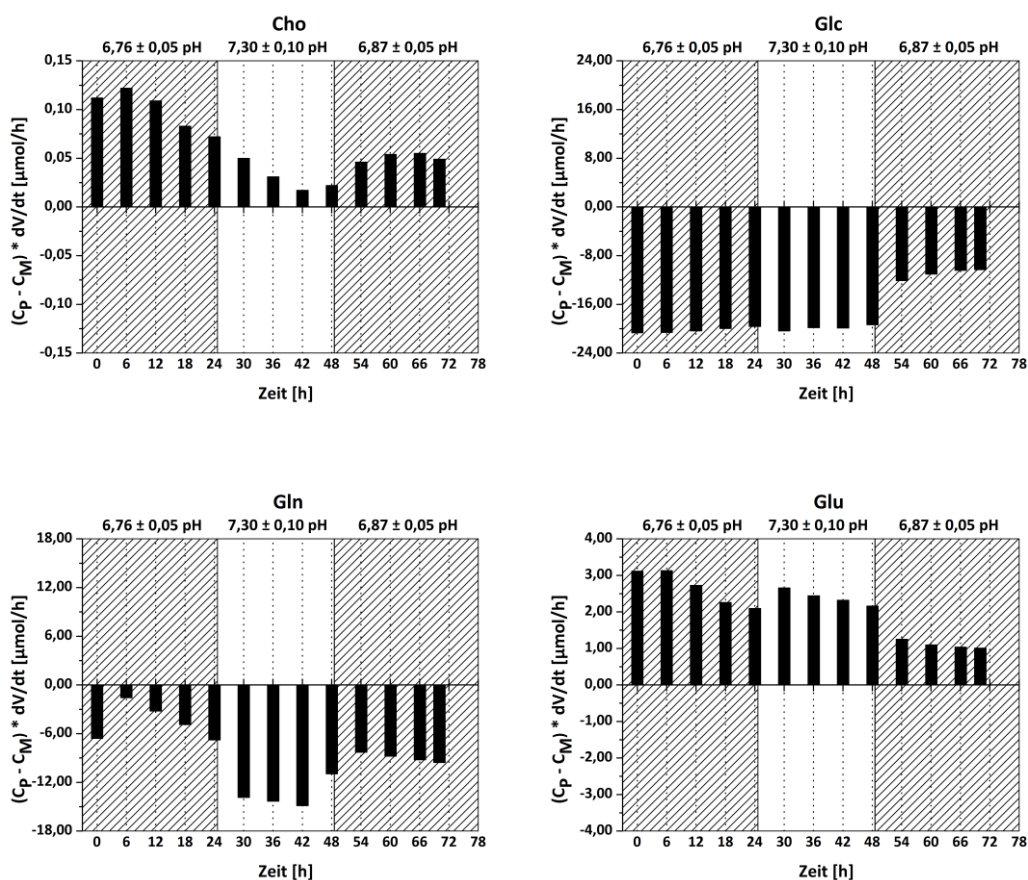
Abbildung 4.21 Verlauf des pH-Wertes in der Perfusionskammer und des Sauerstoffgehaltes im Zu- und Ablauf der Perfusionskammer bei 6 Millionen HTZ-349 unter Perfusion über 70 Stunden, bei Variation des pH-Wertes. **Oben:** Bis zu einer Messdauer von 24 Stunden wurde das Medium mit 6,0 % CO₂ begast, wodurch sich ein mittlerer pH-Wert von $6,76 \pm 0,05$ pH einstellte. In der zweiten Phase, zwischen 24 und 48 Stunden, wurde die CO₂-Begasung abgeschaltet, wodurch ein pH-Wert von $7,30 \pm 0,10$ pH in der Messkammer erreicht wurde. In der letzten Phase ab 48 Stunden wurde mit 20 % CO₂ begast, wodurch sich der pH-Wert wieder in den sauren Bereich verschob und ein Mittelwert von $6,87 \pm 0,05$ pH erreicht wurde. Der physiologischen pH-Wert von 7,4 pH wird durch die gestrichelte Linie angezeigt. Für die Bestimmung der pH-Werte wurde die chemische Verschiebung der H^{ε1}-Resonanz des Histidins in 1D ¹H-NOESY-Spektren bestimmt. **Unten:** Der Sauerstoffgehalt im Zulauf (dunkelblau) wurde durch die Begasung des Mediums mit 21 % O₂ (strichpunktierte Linie) eingestellt. In der Zeit von 1 bis 22 Stunden konnte der Sauerstoffgehalt auf Grund einer technischen Störung nicht aufgezeichnet werden. Der reduzierte Sauerstoffgehalt im Ablauf (hellblau) resultierte aus dem Verbrauch der Zellen. Die dargestellten Sauerstoffwerte wurden bei Raumtemperatur gemessen und auf 37 °C zurückgerechnet. Die Messung in der Perfusionskammer fand bei 37 °C, einer Perforationsrate von 100 µl/min und einer Resonanzfrequenz von 800 MHz statt. Für die Darstellung wurde ein Messintervall von 6 Stunden für den pH-Verlauf und ein Messintervall von einer Stunde für den Sauerstoffverlauf gewählt.

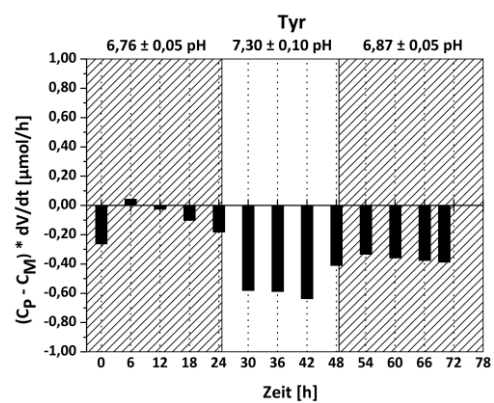
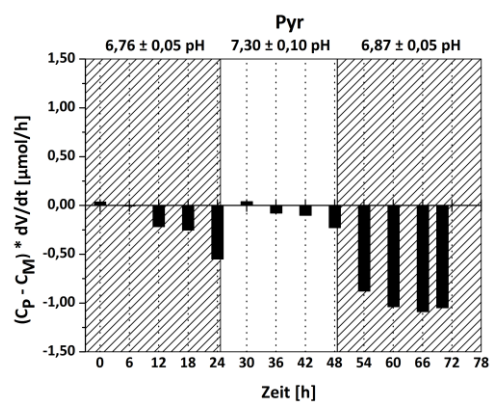
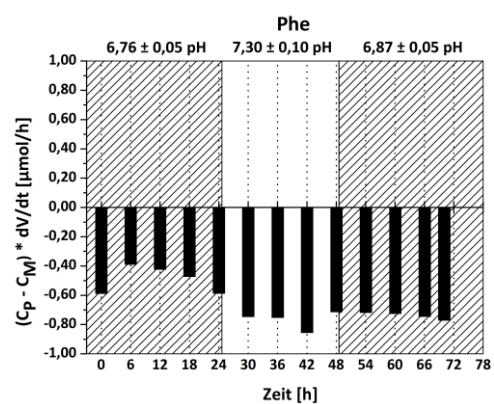
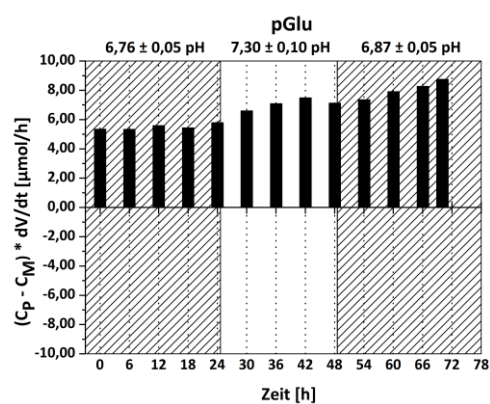
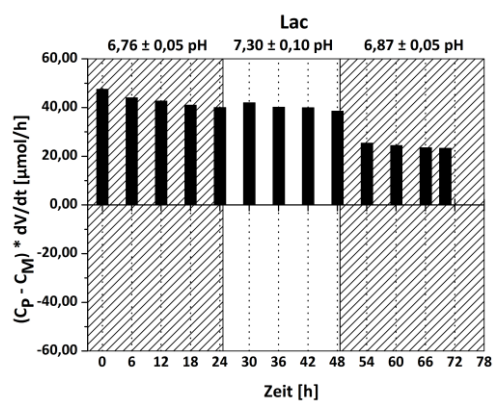
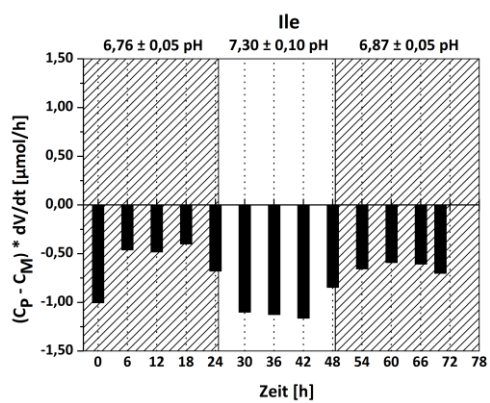
Die metabolische Auswertung der Zellen der Zelllinie HTZ-349 zeigte auch unter variierendem pH-Wert einen deutlichen Verbrauch der Metaboliten Glutamin, Glukose und Pyruvat ([Abbildung 4.22](#)). Im Medium aus dem Sammelbehälter konnte nach der Messung eine Abnahme der Konzentration um 1,201 mM Glutamin, 0,200 mM Glukose und 77 µM Pyruvat nachgewiesen werden ([Tabelle 4.16](#)). Glukose zeigte in der ersten sauren Phase im Vergleich zum Medium eine um 67 % reduzierte Stoffmenge pro Zeit in der Perfusionskammer. Dieser Verbrauch nahm im Laufe der ersten sauren Phase ab und erhöhte sich leicht bei Erreichen des physiologischen pH-Wertes. In der zweiten sauren Phase reduzierte sich der Verbrauch abrupt auf etwa die Hälfte des Wertes bei physiologischem pH. Pyruvat wurde hauptsächlich in den sauren Phasen verbraucht. Bei physiologischem pH wurde nahezu keine Veränderung beobachtet. Dies lag an einer deutlichen Überlagerung mit der Resonanz von Glutamat.

Die Laktat-Synthese nahm über die gesamte Messdauer ab und spiegelte in ihrem Verhalten den Glukose-Verlauf wider. Insbesondere war die Synthese des Laktats in der physiologischen

Phase erhöht und in der zweiten sauren Phase im Mittel um ca. 40 % reduziert. Im Medium wurden insgesamt 0,642 mM Laktat nach der Messung in den ca. 420 ml des Auffangbehälters detektiert.

Der Grund für die stärkere metabolische Reaktion der Zellen in der zweiten sauren Phase lag an einer hohen Glykolyse-Rate der Zellen, einer dichten Zellpackung und variierenden pH-Werten des Mediums durch unterschiedliche Begasung mit CO₂. Auf Grund einer geringeren Stabilität des Agarosegels in diesem Experiment war der Gelfaden durch die Perfusion und die Schwerkraft stärker komprimiert worden als bei den anderen Versuchen. Daher und wegen der hohen Glykolyse-Rate sind auch die Stoffmengen pro Zeit des Laktats hier im Vergleich zu den anderen Messungen sehr stark erhöht, wodurch der pH-Wert in den sauren Bereich verschoben wurde. Bei der jeweils eingestellten CO₂-Begasung war das Medium, welches in die Perfusionskammer zugeleitet wurde in der ersten Phase physiologisch (6 % CO₂), in der zweiten Phase basisch (0 % CO₂) und in der letzten Phase sauer (20 % CO₂). Durch die hohen Laktat-Werte im Messbereich war der resultierende gesamte pH-Wert in der Perfusionskammer jedoch in der ersten Phase sauer, in der zweiten Phase physiologisch und in der dritten Phase wieder sauer. Dies erklärt die unterschiedliche Reaktion der Zellen in den beiden sauren Phasen.





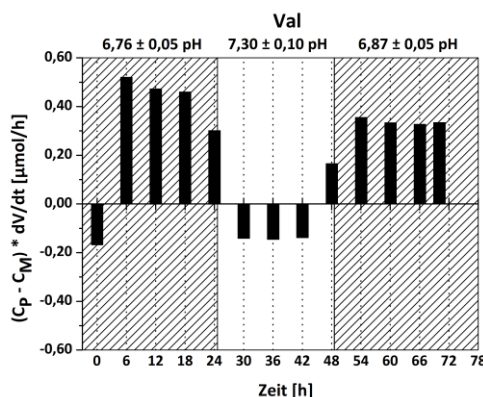


Abbildung 4.22 Zeitlicher Verlauf der Stoffmenge pro Zeit ausgewählter Metaboliten von 6 Millionen HTZ-349 unter Perfusion, bei Variation des pH-Wertes. Gezeigt ist die Differenz der Konzentration der Metaboliten in der Perfusionskammer (C_p) mit der im Medium enthaltenen Konzentration (C_m) multipliziert mit der eingestellten Perfusionsrate (dV/dt) von $100 \mu\text{l/min}$ in 6 Stunden Intervallen. Die einfach schraffierten Flächen markieren Bereiche, in denen der pH-Wert in den sauren Bereich verschoben wurde und die weiße Fläche zeigt den Abschnitt der Messung bei physiologischen pH. Die Konzentrationen wurden aus 1D ^1H -NOESY-Spektren (11 min Aufnahmezeit, 64 Scans) unter Perfusion, bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz und einer Temperatur von 37°C über den NMR-Standard DSS bestimmt, dessen Konzentration im Perfusionsmedium $50 \mu\text{M}$ betrug.

Glutamin startete mit einer um 20 % reduzierten Stoffmenge pro Zeit im Vergleich zum Medium im ersten sauren Abschnitt. Tendenziell nahm der Glutamin-Verbrauch über die gesamte Messung zu, was wie bei den Messungen zuvor hauptsächlich an der spontanen Umwandlung zu Pyro-Glutamat lag. In der Phase des physiologischen pH-Wertes war der Glutamin-Verbrauch deutlich erhöht, im Mittel war er dreimal so groß wie im ersten Abschnitt. Pyro-Glutamat zeigte eine kontinuierliche Zunahme über die gesamte Messung und erreichte einen Konzentrationsüberschuss von $1,048 \text{ mM}$ nach 70 Stunden im Vergleich zum Medium. Bei dem physiologischen pH-Wert war die Stoffmenge pro Zeit im Vergleich zu den sauren Phasen etwas erhöht. Dies stimmt mit der Literatur zur nicht-enzymatischen Umwandlung von Glutamin zu Pyro-Glutamat bei unterschiedlichem pH-Wert überein, wonach die Umwandlung bei physiologischem pH-Wert höher ist als bei saurem pH-Wert [Gilbert et al. 1949].

Cholin und Glutamat zeigten beide wie erwartet erhöhte Stoffmengen pro Zeit im Vergleich zum Medium, welche im zeitlichen Verlauf abnahmen. Jedoch war deren Verhalten bei $7,4 \text{ pH}$ unterschiedlich. Cholin zeigte einen Rückgang der gemessenen Stoffmenge pro Zeit und Glutamat war in dieser Phase erhöht. Im Medium konnte allerdings nur für Glutamat eine erhöhte Konzentration nachgewiesen werden.

Die Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Tyrosin zeigten alle einen erhöhten Verbrauch in den physiologischen Phasen. Im Medium aus dem Sammelbehälter konnte nach der Messung eine Konzentrationsdifferenz von $15 - 50 \mu\text{M}$ im Vergleich zum Ausgangsmedium für die drei Aminosäuren nachgewiesen werden.

Valin zeigte hier, bis auf den Startwert, eine im Vergleich zum Medium erhöhte Stoffmenge pro Zeit in den sauren Phasen, welche insgesamt eine abnehmende Tendenz hatte. In der physiologischen Phase wurde in der Perfusionskammer ein leichter Verbrauch an Valin detektiert. Im Medium aus dem Auffangbehälter konnte nach Beendigung der Messung eine

mit 9 μM sehr kleine Abnahme der Konzentration des Valins im Vergleich mit dem Ausgangsmedium nachgewiesen werden.

Tabelle 4.16 Stoffmenge pro Zeit und Konzentrationen der untersuchten Metaboliten der Zelllinie HTZ-349 unter Perfusion, bei Variation des pH-Wertes. Die Multiplikation der Konzentration der Metaboliten im Medium (C_M) mit der verwendeten Perfusionsrate (dV/dt) von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ beschreibt die Stoffmenge pro Zeit, welche in der Perfusionskammer ohne Zellen gemessen werden würde. C_P^S ist die tatsächlich gemessene Konzentration der Metaboliten in der Perfusionskammer mit Zellen zu Beginn und C_P^E die Konzentration am Ende der Messung. $C_P^S \cdot dV/dt$ und $C_P^E \cdot dV/dt$ beschreiben dementsprechend die gemessene Stoffmenge pro Zeit in der Perfusionskammer mit Zellen zu Beginn und am Ende der Messung nach 70 Stunden. Die Konzentrationen C_P enthalten sowohl intra- als auch extrazelluläre Anteile. Die Variable C_A ist die Konzentration der Metaboliten im Auffangbehälter nach der Messung. Da C_A nur extrazelluläre Metaboliten enthält, beschreibt die Differenz $C_A - C_M$ die Synthese bzw. den Verbrauch des jeweiligen Metaboliten über die gesamte Messdauer. Für die Bestimmung der Konzentrationen wurden 1D ^1H -NOESY-Spektren unter Perfusion, bei 37 °C und 800 MHz Resonanzfrequenz aufgezeichnet.

Metabolit	$C_M \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	$C_P^S \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	$C_P^E \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	C_M [mM]	C_A [mM]	$C_A - C_M$ [mM]
Cho	0,198	0,312	0,246	0,033	0,022	- 0,011
Glc	30,798	10,116	20,484	5,133	4,933	- 0,200
Gln	33,270	26,676	23,694	5,545	4,344	- 1,201
Glu	0,552	3,672	1,560	0,092	0,132	+ 0,040
Ile	4,440	3,438	3,738	0,740	0,725	- 0,015
Lac	0,000	47,532	23,274	0,000	0,642	+ 0,642
pGlu	6,342	11,682	15,090	1,057	2,105	+ 1,048
Phe	2,214	1,626	1,446	0,369	0,319	- 0,050
Pyr	6,930	6,966	5,880	1,155	1,078	- 0,077
Tyr	2,190	1,926	1,806	0,365	0,342	- 0,023
Val	4,452	4,284	4,788	0,742	0,733	- 0,009

Eine metabolische Auswertung der mobilen Proteine konnte wegen Überlagerungen mit den Lipidresonanzen und der geringeren Intensität nur für die Resonanz bei 2,99 ppm (M7) möglich (Abbildung 4.23). Diese zeigte eine Abnahme während der ersten sauren Phase um 25 %. In der physiologischen Phase blieb die Konzentration zunächst konstant und zeigte dann ebenfalls eine leichte Abnahme. Insgesamt fiel der Wert der Proteinresonanz in der physiologischen Phase um 16 % ab. In der letzten sauren Phase zeigte sich weiterhin eine Abnahme, so dass die Proteinresonanz insgesamt um 53 % abnahm.

Die Analyse des Verlaufs der Konzentration der mobilen Lipide ergab, dass der Lipidmetabolismus deutlich durch den pH-Wert beeinflusst wurde (Abbildung 4.23). Alle mobilen Lipidresonanzen zeigten dabei ein vergleichbares Verhalten. Die Konzentration der Lipide erhöhte sich während der sauren Phasen und nahm während der physiologischen Phase leicht ab. Dabei zeigten die Methylengruppe (ML2) und die Methingruppe (ML6) einen identischen Verlauf und einen um das 3,5-fache erhöhten Wert nach über 70 Stunden am Ende der Messung. Die restlichen untersuchten mobilen Lipide lagen am Ende bei 1,1 - 1,7-facher Erhöhung des Ausgangswertes.

Die Lipidresonanzen ML1, ML4 und ML5 waren hauptsächlich zu Beginn von Proteinresonanzen, extrazellulärem Pyro-Glutamat und Glutamin aus dem Medium überlagert. Aber durch den starken Anstieg der Lipidkonzentrationen zu Beginn auf Grund des

pH-Stresses und der Reduzierung der NMR-sichtbaren Proteine um ca. 53 % im Laufe der Messung waren diese Einflüsse deutlich reduziert und praktisch vernachlässigbar. In [Tabelle 4.17](#) sind die Verhältnisse aller mobilen Lipidresonanzen zu den Methylengruppen aufgeführt. Während die Methingruppe über alle Phasen hinweg dasselbe Verhältnis zu den Methylengruppe aufwiesen, zeigten die restlichen Lipidresonanzen ein übereinstimmendes Verhalten. In der ersten sauren Phase nahmen die Verhältnisse deutlich ab, was dem starken Anstieg der Methylengruppe geschuldet war. Während der physiologischen Phase blieben die Lipidverhältnisse dann nahezu konstant und zeigten in der zweiten sauren Phase eine weitere minimale Abnahme. Der Anstieg der mobilen Lipidresonanzen in der ersten und letzten Phase war auf Grund des pH-Stresses zu erwarten und spricht für eine abnehmende Zellvitalität in diesen Phasen. In der physiologischen Phase zeigte sich ein Rückgang der Lipidkonzentrationen, was für eine Zunahme der Lipidsynthese spricht. Zudem deckt sich der zeitliche Verlauf des Sauerstoffverbrauchs mit dem Verhalten der mobilen Lipide.

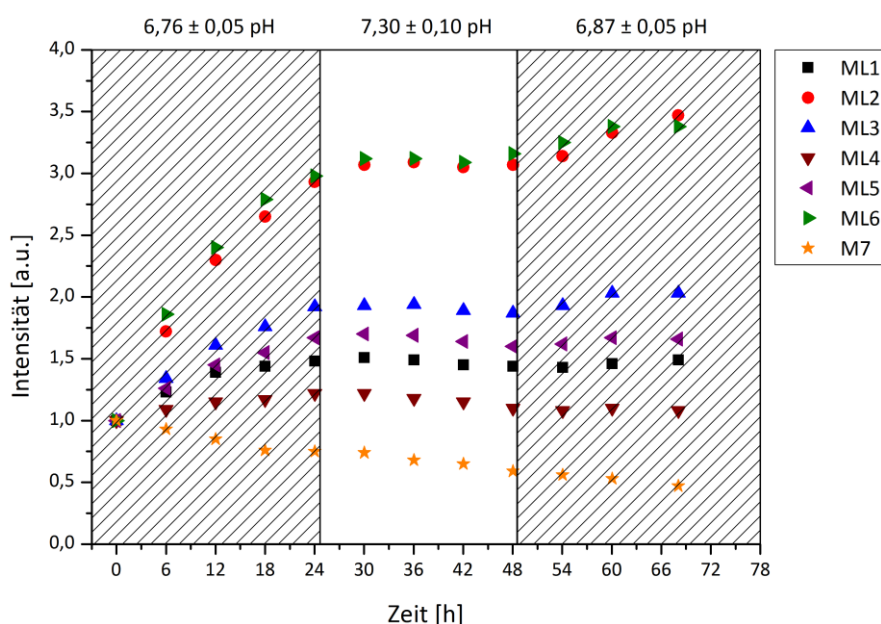


Abbildung 4.23 Verlauf der Integrale der NMR-sichtbaren mobilen Lipide und Proteine der Zelllinie HTZ-349 unter Perfusion, bei Variation des pH-Wertes. Dargestellt sind die Integrale der mobilen Lipide (ML1 - ML6) und der Proteinresonanz M7 in 6 Stunden Intervallen. Die Integrale wurden zur besseren Vergleichbarkeit jeweils auf den Ausgangswert normiert. Die einfach schraffierten Flächen markieren zeitliche Bereiche, in denen der pH-Wert in den sauren Bereich verschoben wurde und die weiße Fläche zeigt den Abschnitt der Messung bei physiologischen pH. Grundlage für die Abbildung waren diffusionsgewichtete ^1H -Spektren bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. ML1 ist die Resonanz von Methylgruppen, ML2 ist die Resonanz von Methylengruppen, ML3 und ML5 sind Resonanzen von gesättigten Fettsäuren und ML4 sowie ML6 sind Resonanzen von ungesättigten Fettsäuren. M7 ist die einzige nicht von mobilen Lipiden überlagerte Proteinresonanz bei 2,99 ppm. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: b-Wert = $7,4 \cdot 10^9 \text{ s}/\text{m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = 0,51 T/m. Der Gradient wurde so gewählt, dass die niedermolekularen Anteile abgeschwächt wurden.

Tabelle 4.17 Verlauf der Verhältnisse der mobilen Lipide der Zelllinie HTZ-349 in Relation zu ML2 unter Perfusion, bei Variation des pH-Wertes. Für die Verhältnisse zu ML2 wurden diffusionsgewichtete ^1H -Spektren bei 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ in einem Intervall von 6 Stunden verwendet. ML1 ist die Resonanz von Methylgruppen, ML2 ist die Resonanz von Methylengruppen, ML3 und ML5 sind Resonanzen von gesättigten Fettsäuren und ML4 sowie ML6 sind Resonanzen von ungesättigten Fettsäuren. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: b -Wert = $7,4 \cdot 10^9 \text{ s}/\text{m}^2$, Δ = 100 ms, δ = 2 ms, α = 0,2 und Gradientenstärke = 0,51 T/m.

Zeit [h]	ML6	ML5	ML4	ML3	ML2	ML1
0	0,15	0,29	0,79	0,22	1,00	0,54
6	0,16	0,22	0,51	0,18	1,00	0,39
12	0,16	0,19	0,40	0,16	1,00	0,33
18	0,16	0,17	0,35	0,15	1,00	0,30
24	0,15	0,17	0,33	0,15	1,00	0,27
30	0,15	0,16	0,32	0,14	1,00	0,27
36	0,15	0,16	0,30	0,14	1,00	0,26
42	0,15	0,16	0,30	0,14	1,00	0,26
48	0,15	0,15	0,28	0,14	1,00	0,25
54	0,15	0,15	0,27	0,14	1,00	0,25
60	0,15	0,15	0,26	0,14	1,00	0,24
68	0,14	0,14	0,25	0,13	1,00	0,23

Durch die Möglichkeit der pH-Einstellung des Mediums und dessen Kontrolle in der Perfusionskammer konnte hier deutlich eine Beeinflussung des Metabolismus humaner Glioblastom-Zellen durch die Veränderung des pH-Wertes nachgewiesen werden. Die Zellen zeigten insgesamt eine hohe Glykolyse-Rate, einen reduzierten Verbrauch an Metaboliten in den sauren Phasen und einen erhöhten Bedarf in der physiologischen Phase. Die Analyse des Sauerstoffverbrauchs deckt sich mit diesen Ergebnissen. Insgesamt zeigte sich ein Rückgang des Sauerstoffverbrauchs über die gesamte Messung, was auf Grund des Mangels an fötalem Kälberserum auch zu erwarten war. Die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs war allerdings in den sauren Phasen nahezu doppelt so groß wie in der physiologischen Phase. Die makromolekularen Resonanzen zeigen ein dazu passendes Bild. Die mobilen Proteine zeigten insgesamt eine Abnahme um grob die Hälfte über die gesamte Dauer der Messung mit einer Abflachung zu Beginn der physiologischen Phase, was für eine Abschwächung der Proteolyse in dieser Phase spricht. Der Anstieg der NMR-sichtbaren mobilen Lipide steht für eine Abnahme der Zellvitalität im Laufe der Messung. Während der physiologischen Phase konnte eine Abflachung bis hin zu einem leichten Rückgang der Lipidkonzentrationen beobachtet werden. Dies spricht für eine Erholung der Zellvitalität im physiologischen Abschnitt, auf Grund der Zunahme des Lipidverbrauchs. Insgesamt wurde die Zellvitalität allerdings auf Grund der langen Phasen unter pH-Stress deutlich reduziert, denn der Zellvitalitätstest am Ende der Messung offenbarte einen Anteil an vitalen Zellen von nur noch 18 %.

4.4 Metabolische Untersuchungen der humanen neuronalen Stammzelllinie ReNCX

Im Folgenden wurde der Metabolismus der humanen neuronalen Stammzelllinie ReNCX unter Perfusion und die Auswirkung einer Behandlung mit einem Antisense Oligonukleotid untersucht, welches später bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) zur Anwendung kommen soll. Dabei wurde jeweils der Stoffwechsel von 6 Millionen ReNCX Zellen bei normoxischen Bedingungen für 72 Stunden im NMR-Spektrometer beleuchtet. Einmal ohne Vorbehandlung und zum Vergleich nach 96-stündiger Kultivierung mit 10 μ M Antisense Oligonukleotid, welches durch Verminderung der TGF-beta Signalkaskade zu einer Erhöhung der Proliferationsrate der Stammzellen führen soll. Analog zur Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 wurden dabei die Verläufe von Metaboliten wie Glukose, Pyruvat, Laktat, Glutamin und von weiteren Aminosäuren untersucht. Außerdem wurde auch hier der NMR-sichtbare Lipid- und Proteinmetabolismus in beiden Fällen analysiert.

4.4.1 Anpassung des Perfusions-Systems an die neurale Stammzelllinie

Vor der metabolischen Untersuchung der neuronalen Stammzelllinie ReNCX mit dem Perfusions-System mussten potenzielle Auswirkungen auf die Zellvitalität durch die Einbettung dieser Zelllinie in das Agarosegel und die Gültigkeit der Berechnung des pH-Wertes und der Eichung der Sauerstoffsensoren in dem ReNCX Medium überprüft werden. Zudem musste die notwendige CO₂-Konzentration ermittelt werden, um einen physiologischen pH-Wert im ReNCX Medium zu erreichen.

Zur Überprüfung einer möglichen Beeinflussung der Zellvitalität durch das Einbetten der Zellen in das Agarosegel wurden mehrfach Zellen in der für Perfusionmessungen üblichen Zelldichte nach Standardprozedur in einen Agarosefaden eingebettet. Unmittelbar nach Erstellung des Gelfadens wurden die Zellen mechanisch aus dem Faden gelöst. Der Vergleich der ermittelten Zellvitalität vor und nach der Einbettung zeigte im Mittel in beiden Fällen einen Anteil an lebenden Zellen von 93 %. Damit konnte eine Beeinflussung der Zellvitalität durch das Einbetten und mechanische Herauslösen der neuronalen Stammzellen ausgeschlossen werden.

Für die ursprüngliche Berechnung des pH-Wertes bei der Zelllinie HTZ-349 wurden die Parameter aus [Kapitel 4.1.2 \(Tabelle 4.2\)](#) verwendet. Die über die Henderson-Hasselbalch Gleichung erhaltenen Fitparameter waren allerdings unter anderem von der Zusammensetzung des Mediums abhängig. Das Medium für die Zelllinie ReNCX war größtenteils in den Bestandteilen dem Medium der Zelllinie HTZ-349 ähnlich, jedoch waren deren Konzentrationen verschieden und zudem enthielt das ReNCX-Medium mit HEPES einen weiteren Puffer.

Die Gültigkeit der pH-Bestimmung wurde mit 5 Proben durch die Berechnung aus der chemischen Verschiebung von Histidin im pH-Bereich von 5,62 - 7,83 pH überprüft. Dabei ergaben sich hauptsächlich für Werte außerhalb des physiologischen Bereichs größere Abweichungen. Durch einen Fit der Fehlerbereiche und der Berechnung deren Schnittpunkte mit dem Sollwert konnte ein Schnittbereich von 7,15 - 7,83 pH ermittelt werden. In diesem Bereich war die Berechnung des pH-Werts mit den ursprünglichen Fitparametern innerhalb der Fehlergrenzen für das ReNCX-Medium weiterhin gültig. Auf eine Ermittlung eines eigenen Parametersatzes für das ReNCX-Medium konnte damit verzichtet werden, da die metabolischen Untersuchungen bei physiologischem pH-Wert stattfanden.

Die Eichung der Sauerstoffsensoren wurde durch die Perfusion mit dem ReNCX-Medium bei einer Begasung mit 21,0 % O₂ und 0,0 % O₂ sowie einer Rate von 100 µl/min bei 37 °C überprüft. Es zeigte sich, dass der Sensor im Ablauf der Perfusionskammer innerhalb der Fehlergrenzen mit den eingestellten Sauerstoffkonzentrationen übereinstimmte, während der Sensor im Zulauf größere Abweichungen aufwies. Durch die Bestimmung eines Korrekturfaktors (0,92), ausgehend von den Mittelwerten früherer Messungen mit der Glioblastom-Zelllinie, konnte der gemessene Sauerstoffgehalt auf den tatsächlichen Sauerstoffgehalt umgerechnet werden. Damit konnte ohne Veränderung des Perfusions-Systems und erneuter Eichung der Sensoren die Zurückrechnung der gemessenen Sauerstoffwerte bei Raumtemperatur auf 37 °C aus [Kapitel 4.1.3.2](#) weiterverwendet werden.

Als Startkonzentration für die Begasung mit Kohlendioxid zur Einstellung eines physiologischen pH-Werts wurde für das Medium ohne Zellen 5 % CO₂ ermittelt. Dieser Wert musste dann je nach metabolischer Aktivität der Zellen während der Perfusionsmessung angepasst werden.

4.4.2 ReNCX unter Perfusion bei normoxischen Bedingungen

Zur metabolischen Analyse der neuralen Stammzelllinie ReNCX unter Perfusion wurden, wie bei den Tumorzellen, 6 Millionen Zellen in 300 µl 0,5%iger Agarose eingebettet und über 72 Stunden bei einer Perfusionsrate von 100 µl/min untersucht. Der pH-Wert wurde, nach anfänglicher Optimierung, durch die Begasung mit 4,0 % CO₂ auf einem physiologischen Wert eingestellt. In der Perfusionskammer ergab sich damit ein mittlerer pH-Wert von $7,40 \pm 0,11$ pH über die gesamte Messung. Der Metabolismus der ReNCX-Zellen sollte unter normoxischen Bedingungen untersucht werden, dementsprechend wurde das Medium mit 21,0 % O₂ begast. Im Mittel ergab sich im Zulauf zur Perfusionskammer eine Sauerstoffkonzentration von $21,2 \pm 1,2$ % O₂ ([Abbildung 4.24](#)). Die im Ablauf der Perfusionskammer gemessene Sauerstoffkonzentration veränderte sich über die Messung nur geringfügig. Zu Beginn wurde nach Rückrechnung auf 37 °C eine Konzentration von $14,0 \pm 1,2$ % O₂ gemessen und nach drei Tagen war der Sauerstoffgehalt auf $14,4 \pm 1,2$ % gestiegen. Unter Berücksichtigung des Messfehlers lag hier also ein konstanter Sauerstoffverbrauch über die gesamte Messung vor. Die nach der Messung mit Trypanblau ermittelte Zellvitalität war nach drei Tagen unter Perfusion noch relativ hoch und lag bei einem Anteil an lebenden Zellen

von 65 %. Allerdings ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass im Medium der Stammzellen auch Wachstumsfaktoren enthalten waren, wodurch eine Zellproliferation möglich war. Daher kann hier nicht wie bei den Glioblastom-Zellen, bei denen keine Wachstumsfaktoren enthalten waren, durch den prozentualen Anteil an lebenden Zellen auf die tatsächliche Anzahl an vitalen Zellen geschlossen werden. Über die Sauerstoffverbrauchsrate, welche in diesem Fall zu Beginn 1,2 % O_2 / $1 \cdot 10^6$ Zellen betrug, ist es zusammen mit dem Sauerstoffverbrauch dennoch möglich eine Abschätzung vorzunehmen. Unter der Annahme eines gleichbleibenden Sauerstoffverbrauchs, da konstant normoxische Bedingungen vorherrschten, kann anhand des Sauerstoffverbrauchs von 6,6 % O_2 am Ende der Messung eine Anzahl von 5,3 Millionen lebender Zellen berechnet werden. Da die Zellvitalität zu Beginn bei 94 % lag, bedeutet dies, dass sich gegen Ende der Messung nur etwa 0,3 Millionen vitaler Zellen weniger in der Perfusionskammer befanden als zu Beginn. Dies würde mit dem praktisch konstanten Sauerstoffverbrauch über die gesamte Messung übereinstimmen. Ausgehend von dem prozentualen Anteil welcher durch den Trypanblau-Test ermittelt wurde kann somit eine Gesamtzellzahl von 8,2 Millionen Zellen in der Perfusionskammer am Ende der Messung berechnet werden. Dementsprechend hätte sich die Gesamtanzahl an Zellen in 72 Stunden um etwa 2,2 Millionen Zellen erhöht.

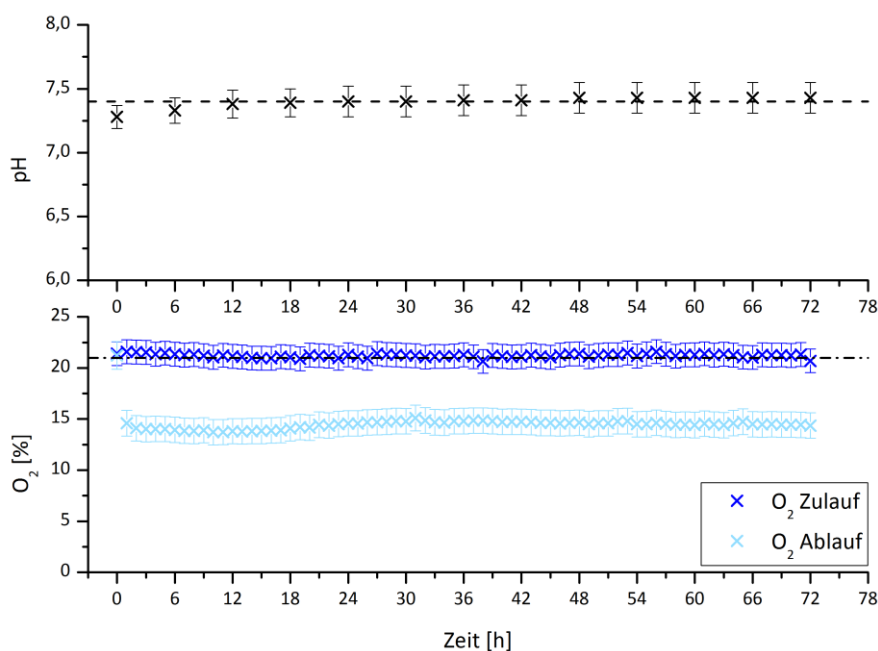


Abbildung 4.24 Verlauf des pH-Wertes in der Perfusionskammer und des Sauerstoffgehaltes im Zu- und Ablauf der Perfusionskammer bei 6 Millionen ReNCX unter Perfusion über 72 Stunden, bei normoxischen Bedingungen. **Oben:** Die Einstellung des physiologischen pH-Wertes von 7,4 pH (gestrichelte Linie) erfolgte durch Begasung des Mediums mit 4,0 % CO_2 . Die chemische Verschiebung der $H^{\epsilon 1}$ -Resonanz des Histidins wurde durch 1D 1H -NOESY-Spektren bestimmt und in die entsprechenden pH-Werte umgerechnet. **Unten:** Der Sauerstoffgehalt im Zulauf (dunkelblau) wurde durch die Begasung des Mediums mit 21 % O_2 (strichpunktierte Linie) eingestellt. Der reduzierte Sauerstoffgehalt im Ablauf (hellblau) resultierte aus dem Verbrauch der Zellen. Die dargestellten Sauerstoffwerte wurden bei Raumtemperatur gemessen und auf 37 °C zurückgerechnet. Die Messung in der Perfusionskammer fand bei 37 °C, einer Perfusionsrate von 100 $\mu l/min$ und einer Resonanzfrequenz von 800 MHz statt. Für die Darstellung wurde ein Messintervall von 6 Stunden für den pH-Verlauf und ein Messintervall von einer Stunde für den Sauerstoffverlauf gewählt.

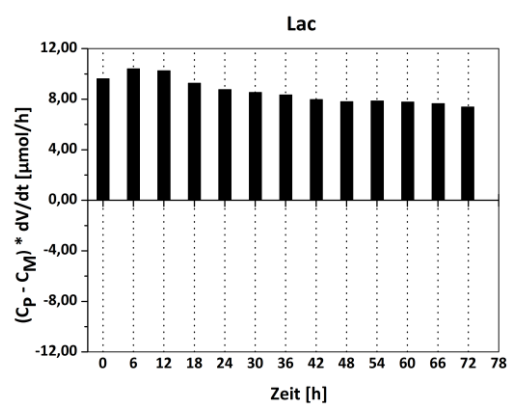
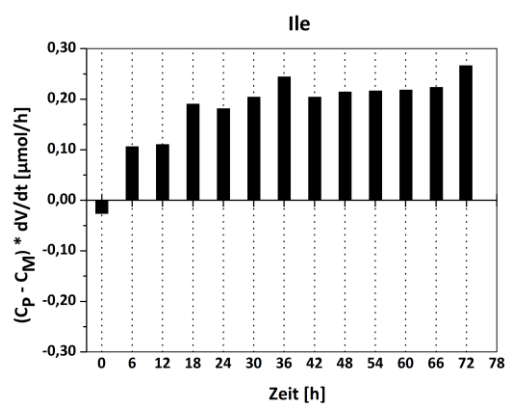
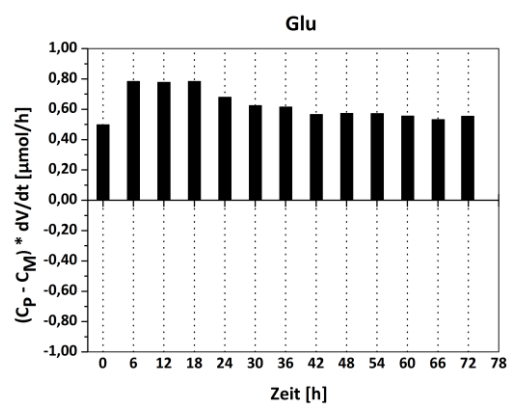
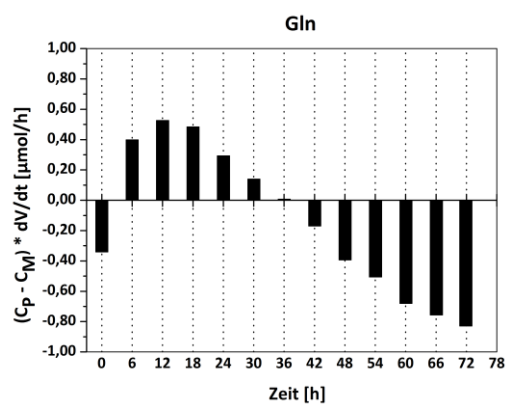
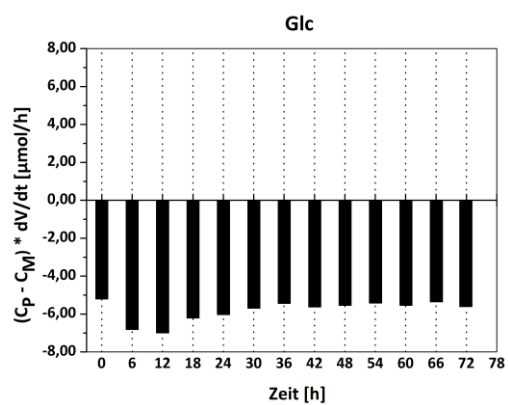
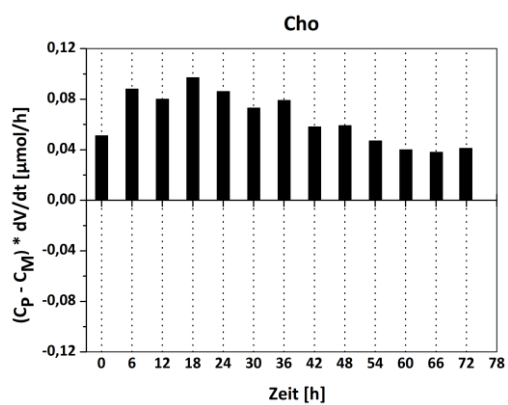
Die metabolische Analyse ergab im Vergleich zum Medium erhöhte Stoffmengen pro Zeit für Cholin, Glutamat, Isoleucin, Laktat, Pyro-Glutamat, Pyruvat und Valin ([Abbildung 4.25](#)). Niedrigere Stoffmengen pro Zeit wurden für Glukose, Phenylalanin und Tyrosin ermittelt. Glutamin wurde durch eine Überlagerung mit einer HEPES-Resonanz beeinflusst und zeigte in der ersten Hälfte eine höhere und in der zweiten Hälfte eine niedrigere Stoffmenge pro Zeit als im Medium.

Die Stammzellen zeigten, wie die Tumorzellen, eine hauptsächliche metabolische Umsetzung der Metaboliten Glukose und Glutamin. Im Auffangbehälter konnte eine Konzentrationsabnahme von 0,599 mM Glukose und 0,110 mM Glutamin nachgewiesen werden ([Tabelle 4.18](#)). Der Pyruvat-Gehalt des Mediums änderte sich dagegen praktisch nicht (+ 3 μ M), jedoch zeigte die Analyse des Stoffmengenverlaufs pro Zeit in der Perfusionskammer erhöhte Werte im Vergleich zum Medium, mit einem Maximum bei 12 Stunden. Dies lag hier an der Überlagerung mit der Resonanz des Glutamats. Der Glukose-Verbrauch bewegte sich im Laufe der Messung zwischen 5 - 7 % des im Medium vorhandenen Zuckers, wobei nach einem anfänglichen 12-stündigen Anstieg der Verbrauch wieder auf das ursprüngliche Niveau zurückfiel. Die Glutamin-Resonanz wurde hier vor allem die ersten 36 Stunden durch den intrazellulären Untergrund und HEPES beeinflusst. Danach zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme des Glutamin-Konsums.

Die Laktat-Synthese verhielt sich dem Glukose-Verbrauch entgegengesetzt. Im Medium konnten nach der Messung in den ca. 432 ml Medium aus dem Auffangbehälter insgesamt 0,785 mM Laktat nachgewiesen werden. Dementsprechend zeigten die neuronalen Stammzellen zwar ein glykolytisches Verhalten, aber im Vergleich zu den Glioblastom-Zellen war diese deutlich geringer ausgeprägt. Eine genaue Analyse der metabolischen Umsetzung der Glukose und wird in [Kapitel 4.5](#) gegeben.

Pyro-Glutamat zeigte eine kontinuierliche und gleichmäßige Zunahme über die gesamte Messung und erreichte eine um 0,399 mM erhöhte Endkonzentration im Vergleich zum Ausgangsmedium. Wie auch schon beim Medium der Tumorzellen entsprach dies dem entgegengesetzten Verhalten von Glutamin, da die Pyro-Glutamat-Synthese auf eine spontane Umwandlung des Glutamins zurückzuführen ist. Die höhere Konzentrationsdifferenz im Auffangbehälter im Vergleich zum Glutamin-Verbrauch wurde hier durch eine Überlagerung des Pyro-Glutamats und Glutamin mit HEPES verursacht.

Die Stoffmengenverläufe pro Zeit von Cholin und Glutamat ergaben erhöhte Werte im Vergleich zum Medium. Beide Metaboliten zeigten die ersten 18 Stunden einen Anstieg und fielen dann bis zum Ende auf das ursprüngliche Niveau zurück. Dabei erhöhte sich die anfängliche Stoffmenge pro Zeit des Cholins um maximal 90 % und die des Glutamats auf einen Spitzenwert von 57 % im Vergleich zum Medium. Im Auffangbehälter dagegen konnte nur eine Erhöhung der Glutamat-Konzentration um 16 μ M nachgewiesen werden, was für intrazelluläre Anteile des Cholins in der Perfusionskammer spricht.



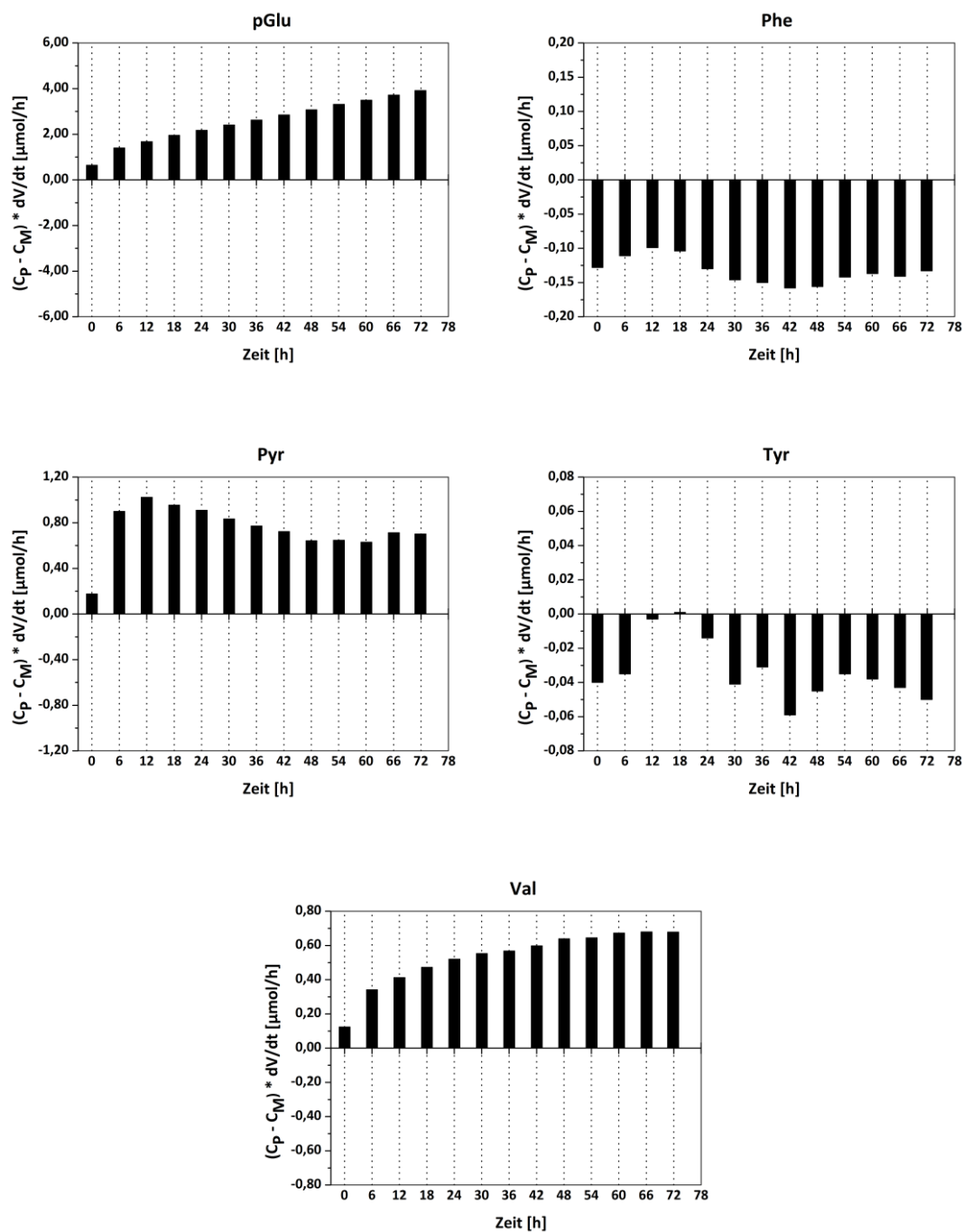


Abbildung 4.25 Zeitlicher Verlauf der Stoffmenge pro Zeit ausgewählter Metaboliten von 6 Millionen ReNCX unter Perfusion, bei normoxischen Bedingungen. Gezeigt ist die Differenz der Konzentration der Metaboliten in der Perfusionskammer (C_p) mit der im Medium enthaltenen Konzentration (C_m) multipliziert mit der eingestellten Perfusionsrate (dV/dt) von 100 $\mu\text{l/min}$ in 6 Stunden Intervallen. Die Konzentrationen wurden aus 1D ^1H -NOESY-Spektren (11 min Aufnahmezeit, 64 Scans) unter Perfusion, bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz und einer Temperatur von 37 °C über den NMR-Standard DSS bestimmt, dessen Konzentration im Perfusionsmedium 50 μM betrug.

Tabelle 4.18 Stoffmenge pro Zeit und Konzentrationen der untersuchten Metaboliten der Zelllinie ReNCX unter Perfusion, bei normoxischen Bedingungen. Die Multiplikation der Konzentration der Metaboliten im Medium (C_M) mit der verwendeten Perfusionsrate (dV/dt) von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ beschreibt die Stoffmenge pro Zeit, welche in der Perfusionskammer ohne Zellen gemessen werden würde. C_P^S ist die tatsächlich gemessene Konzentration der Metaboliten in der Perfusionskammer mit Zellen zu Beginn und C_P^E die Konzentration am Ende der Messung. $C_P^S \cdot dV/dt$ und $C_P^E \cdot dV/dt$ beschreiben dementsprechend die gemessene Stoffmenge pro Zeit in der Perfusionskammer mit Zellen zu Beginn und am Ende der Messung nach 72 Stunden. Die Konzentrationen C_P enthalten sowohl intra- als auch extrazelluläre Anteile. Die Variable C_A ist die Konzentration der Metaboliten im Auffangbehälter nach der Messung. Da C_A nur extrazelluläre Metaboliten enthält, beschreibt die Differenz $C_A - C_M$ die Synthese bzw. den Verbrauch des jeweiligen Metaboliten über die gesamte Messdauer. Für die Bestimmung der Konzentrationen wurden 1D ^1H -NOESY-Spektren unter Perfusion, bei 37 °C und 800 MHz Resonanzfrequenz aufgezeichnet.

Metabolit	$C_M \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	$C_P^S \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	$C_P^E \cdot dV/dt$ [mmol/h]	C_M [mM]	C_A [mM]	$C_A - C_M$ [mM]
Cho	0,360	0,408	0,402	0,060	0,046	- 0,014
Glc	97,794	92,592	92,184	16,299	15,700	- 0,599
Gln	13,962	13,620	13,134	2,327	2,217	- 0,110
Glu	0,282	0,780	0,834	0,047	0,063	+ 0,016
Ile	2,322	2,298	2,586	0,387	0,390	+ 0,003
Lac	0,000	9,606	7,374	0,000	0,785	+ 0,785
pGlu	1,110	1,752	5,028	0,185	0,584	+ 0,399
Phe	1,200	1,074	1,068	0,200	0,191	- 0,009
Pyr	2,772	2,946	3,474	0,462	0,465	+ 0,003
Tyr	1,188	1,146	1,140	0,198	0,196	- 0,002
Val	2,520	2,646	3,198	0,420	0,436	+ 0,016

Die Aminosäuren Isoleucin und Valin zeigten höhere Stoffmengen pro Zeit in der Perfusionskammer im Vergleich zum Medium, während sich bei Phenylalanin und Tyrosin ein Verbrauch ergab. Dabei nahm die Stoffmenge pro Zeit des Isoleucins hauptsächlich die ersten 12 Stunden zu und blieb dann nahezu konstant, während Valin wie auch schon bei den Glioblastom-Zellen über die gesamte Messung anstieg. Im Medium aus dem Sammelbehälter konnte hauptsächlich die Zunahme der Valin-Konzentration (16 μM) beobachtet werden, während sich die Konzentration des Isoleucins mit 3 μM praktisch nicht änderte. Dies lag an einer Überlagerung des Isoleucins mit der hier stark ausgeprägten Methylresonanz der mobilen Lipide in der Perfusionskammer, wodurch auch die erhöhten Werte in der Perfusionskammer erklärt würden. Phenylalanin und Tyrosin zeigten zwischen 6 und 24 Stunden einen leichten Rückgang des Verbrauchs, danach blieb der Verbrauch der Metaboliten relativ konstant. Bei beiden Metaboliten war die Konzentrationsabnahme im Medium des Auffangbehälters mit 2 - 9 μM sehr gering ausgeprägt, aber auch die ermittelten Stoffmengen pro Zeit in der Perfusionskammer zeigten nur einen minimalen Unterschied zu den Stoffmengen im Medium.

Eine Auswertung der NMR-sichtbaren mobilen Proteine war bei den neuronalen Stammzellen auf Grund der starken Lipidresonanzen erschwert. Zudem war die einzige nicht von den Lipiden überlagerte und damit sichtbare Proteinresonanz M7 bei 2,99 ppm in den diffusionsgewichteten Spektren hier teilweise durch das im Medium enthaltene HEPES beeinflusst. Da der pH-Wert während der Messung aber relativ konstant blieb war diese Beeinflussung gleichbleibend und somit konnte der Proteinverlauf analysiert werden

(Abbildung 4.26). Im Gegensatz zu den Glioblastom-Zellen zeigte sich hier eine anfängliche Zunahme des Proteingehaltes um 30 % und im Anschluss fiel die Proteinkonzentration bis zum Ende der Messung nahezu linear auf das Ausgangsniveau ab. Die erhöhten Proteinwerte während der Messung sprechen zumindest zu Beginn für eine Proteinsynthese, was durch die hier enthaltenen Wachstumsfaktoren EGF und FGF-b und der damit verbundenen Möglichkeit zur Proliferation begünstigt wäre.

Die Analyse des Lipidmetabolismus durch die Auswertung des Konzentrationsverlaufs in diffusionsgewichteten Spektren ergab für alle Lipidresonanzen ein identisches Bild (Abbildung 4.26). Nach einem stärkeren Anstieg in der ersten Hälfte der Messung flachte die Zunahme kontinuierlich ab und zeigte gegen Ende der Messung teilweise leicht rückläufige Werte. Den stärksten Anstieg verzeichnete die Methylengruppe (ML2) mit einer 2,9-fachen Erhöhung des Ausgangswertes. Die Lipidresonanzen ML1, ML3, ML5 und ML6 lagen dabei mit einer durchschnittlichen maximalen Erhöhung um das 2,4-fache nicht weit vom Maximum der ML2-Resonanz entfernt. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu den Messungen mit den Glioblastom-Zellen, denn dort zeigte die Methylen- (ML2) und die Methinresonanz (ML6) einen deutlich stärkeren Anstieg als die restlichen mobilen Lipide. Hier war dagegen der Verlauf der ML3-Resonanz dem Anstieg der Methylengruppe am nächsten. ML4 zeigte dagegen wie auch schon bei den Glioblastom-Zellen mit einer maximalen Erhöhung auf die 1,9-fache Ausgangskonzentration den geringsten Zuwachs.

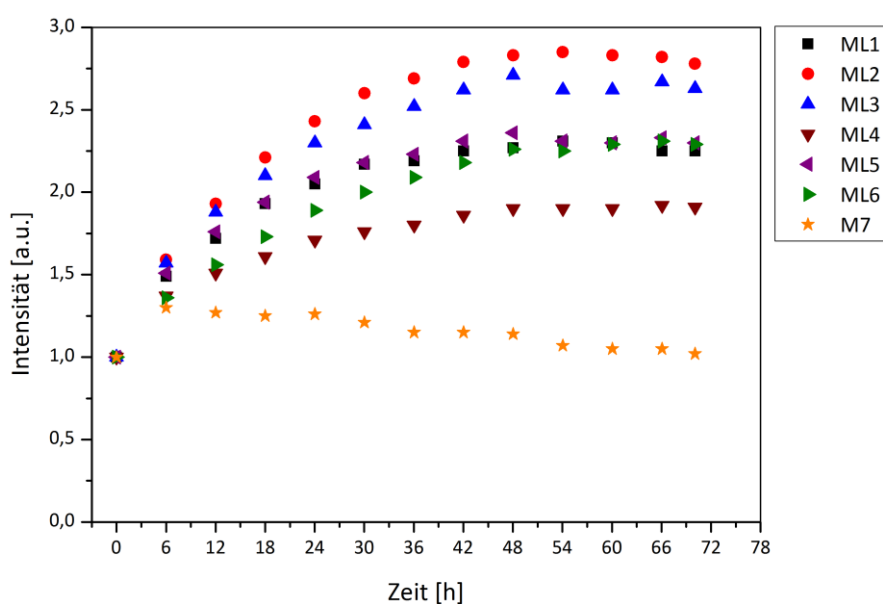


Abbildung 4.26 Verlauf der Integrale der NMR-sichtbaren mobilen Lipide und Proteine der Zelllinie ReNCX unter Perfusion, bei normoxischen Bedingungen. Dargestellt sind die Integrale der mobilen Lipide (ML1 - ML6) und der Proteinresonanz M7 in 6 Stunden Intervallen. Die Integrale wurden zur besseren Vergleichbarkeit jeweils auf den Ausgangswert normiert. Grundlage für die Abbildung waren diffusionsgewichtete ^1H -Spektren bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. ML1 ist die Resonanz von Methylgruppen, ML2 ist die Resonanz von Methylengruppen, ML3 und ML5 sind Resonanzen von gesättigten Fettsäuren und ML4 sowie ML6 sind Resonanzen von ungesättigten Fettsäuren. M7 ist die einzige nicht von mobilen Lipiden überlagerte Proteinresonanz bei 2,99 ppm. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: b-Wert = $7,4 \cdot 10^9 \text{ s}/\text{m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = 0,51 T/m. Der Gradient wurde so gewählt, dass die niedermolekularen Anteile abgeschwächt wurden.

Die bei der Zelllinie HTZ-349 auftretende Überlagerung mit den Resonanzen der mobilen Proteine in den diffusionsgewichteten Spektren war hier auf Grund der hohen Intensitäten der Lipidresonanzen zu vernachlässigen. Auch die Überlagerung mit extrazellulären Metaboliten, die bei der Zelllinie HTZ-349 vor allem mit ML4 überlagerten, war hier vernachlässigbar, da der Zuwachs an Pyro-Glutamat und die Glutamin-Konzentration im ReNCX Medium im Vergleich zum Medium der Tumorzellen um mehr als 50 % reduziert war.

Tabelle 4.19 zeigt das Verhältnis der mobilen Lipide zur Methylenresonanz ML2. Der Verlauf der Verhältnisse zeigte, dass zu Beginn ein etwas größerer Anstieg von ML2 zu beobachten war, da die Verhältnisse bis auf ML3 alle innerhalb der ersten 30 Stunden einen leichten Abfall aufwiesen. Danach blieben alle Verhältnisse konstant, was einer identischen Entwicklung aller Lipide ab diesen Zeitpunkt entsprach. Der Verlauf von ML3 war hier nahezu konstant und zeigte damit ein der Methylenresonanz sehr ähnliches Verhalten.

Tabelle 4.19 Verlauf der Verhältnisse der mobilen Lipide der Zelllinie ReNCX in Relation zu ML2 unter Perfusion, bei normoxischen Bedingungen. Für die Verhältnisse zu ML2 wurden diffusionsgewichtete ^1H -Spektren bei 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ in einem Intervall von 6 Stunden verwendet. ML1 ist die Resonanz von Methylgruppen, ML2 ist die Resonanz von Methylengruppen, ML3 und ML5 sind Resonanzen von gesättigten Fettsäuren und ML4 sowie ML6 sind Resonanzen von ungesättigten Fettsäuren. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: $b\text{-Wert} = 7,4 \cdot 10^9 \text{ s/m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = 0,51 T/m.

Zeit [h]	ML6	ML5	ML4	ML3	ML2	ML1
0	0,11	0,17	0,23	0,15	1,00	0,21
6	0,10	0,16	0,20	0,15	1,00	0,20
12	0,09	0,16	0,18	0,15	1,00	0,19
18	0,09	0,15	0,17	0,15	1,00	0,19
24	0,09	0,15	0,17	0,14	1,00	0,18
30	0,09	0,14	0,16	0,14	1,00	0,18
36	0,09	0,14	0,16	0,14	1,00	0,17
42	0,09	0,14	0,16	0,14	1,00	0,17
48	0,09	0,14	0,16	0,15	1,00	0,17
54	0,09	0,14	0,16	0,14	1,00	0,17
60	0,09	0,14	0,16	0,14	1,00	0,17
66	0,09	0,14	0,16	0,15	1,00	0,17
70	0,09	0,14	0,16	0,15	1,00	0,17

Durch die Anpassung des Perfusions-Systems und der Sensoren war es möglich, die humane neurale Stammzelllinie ReNCX unter normoxischen Bedingungen zu untersuchen. Die Zellen zeigten in den ersten 12 Stunden eine erhöhte Glykolyse und im Anschluss einen konstanten Verbrauch an Glukose. Der Sauerstoffverbrauch wies nach einer minimalen Zunahme zu Beginn eine Abnahme von 1,5 % O_2 zwischen 10 und 30 Stunden auf und blieb dann bis zum Ende auf einem nahezu konstanten Niveau. Die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin zeigten in diesem Zeitraum auch einen reduzierten Verbrauch. Der Anteil an mobilen Lipide nahm während der ersten Hälfte der Messung kontinuierlich zu und erreichte dann ein

annähernd konstantes Niveau. Der Proteingehalt zeigte zu Beginn eine deutliche Zunahme um ca. 30 % und nahm nach einer nahezu konstanten Phase bis zum Ende der Messung kontinuierlich auf das Ausgangsniveau ab. Nach der Messung konnte schließlich ein vitaler Anteil an Zellen von 65 % und rechnerisch damit eine Anzahl von ca. 5,3 Millionen lebender Zellen bestimmt werden, was nur 0,3 Millionen vitaler Zellen weniger waren als zu Beginn der Messung. Die geringe Abnahme des Sauerstoffverbrauchs von nur 0,4 % O₂ über die 72 Stunden unterstützt diese Abschätzung. Insgesamt zeigte diese Messung, dass mit dem etablierten Perfusions-System auch neurale Stammzellen über mehrere Tage metabolisch untersucht werden können. Durch die Möglichkeit verschiedene Medien durch das System zu pumpen und die Messung des Sauerstoffgehalts und des pH-Wertes daran anzupassen ist das Perfusions-System mit relativ geringem Aufwand für eine Vielzahl verschiedener Zelltypen einsetzbar.

4.4.3 Mit Antisense Oligonukleotid behandelte ReNCX unter Perfusion bei normoxischen Bedingungen

Durch eine 4-tägige Vorbehandlung der neuronalen Stammzellen der Zelllinie ReNCX mit 10 µM eines Antisense Oligonukletids wurde die Expressionsrate des TGF-beta Rezeptors TGFRII reduziert. Zur Untersuchung der metabolischen Auswirkungen der Behandlung mit dem Antisense Oligonukleotid wurden, analog zur metabolischen Analyse ohne Behandlung, 6 Millionen behandelte Zellen in 300 µl 0,5 %iger Agarose eingebettet. Der Zellmetabolismus wurde für 72 Stunden bei einer Perfusionsrate von 100 µl/min und normoxischen Bedingungen sowie einem physiologischen pH-Wert metabolisch untersucht. Durch die Begasung mit 4,0 % CO₂ ergab sich ein mittlerer pH-Wert von $7,39 \pm 0,12$ pH in der Perfusionskammer über die gesamte Messung ([Abbildung 4.27](#)). Der Sauerstoffgehalt des Mediums wurde durch die Begasung mit 21,0 % O₂ im normoxischen Bereich gehalten. Im Mittel wurde im Zulauf der Perfusionskammer ein Wert von $21,3 \pm 1,2$ % O₂ gemessen. Im Ablauf der Kammer wurde zu Beginn eine Sauerstoffkonzentration von ca. $16,4 \pm 1,3$ % O₂ gemessen und gegen Ende waren noch $17,8 \pm 1,3$ % O₂ im Medium enthalten. Der Sauerstoffverbrauch nahm damit über die gesamte Messung um 1,4 % O₂ ab. Das entspricht einer prozentualen Abnahme von ca. 30 % im Vergleich zum Sauerstoffverbrauch zu Beginn der Messung. Die Überprüfung der Zellvitalität nach der 3-tägigen Perfusionsmessung ergab einen Anteil an lebenden Zellen von 58 %. Auch hier wurde analog zur Messung ohne Vorbehandlung die Anzahl der lebenden Zellen über die Sauerstoffverbrauchsrate und dem Sauerstoffverbrauch am Ende der Messung bestimmt. Dabei ergab sich, unter der Annahme einer gleichbleibenden Sauerstoffverbrauchsrate, eine Anzahl von 4,0 Millionen lebender Zellen nach 72 Stunden. Da der Anteil an lebenden Zellen zu Beginn bei 95 % lag, hatte sich die Gesamtzahl an vitalen Zellen rechnerisch um 1,7 Millionen Zellen verringert. Ausgehend von einem mit dem Trypanblau ermittelten prozentualen Anteil an lebenden Zellen von 58 % am Ende der Messung ergäbe sich dann eine berechnete Gesamtzellzahl von 6,8 Millionen

Zellen nach 72 Stunden. Demnach hätte sich die Gesamtzahl der neuronalen Stammzellen bei dieser Messung um etwa 0,8 Millionen Zellen erhöht.

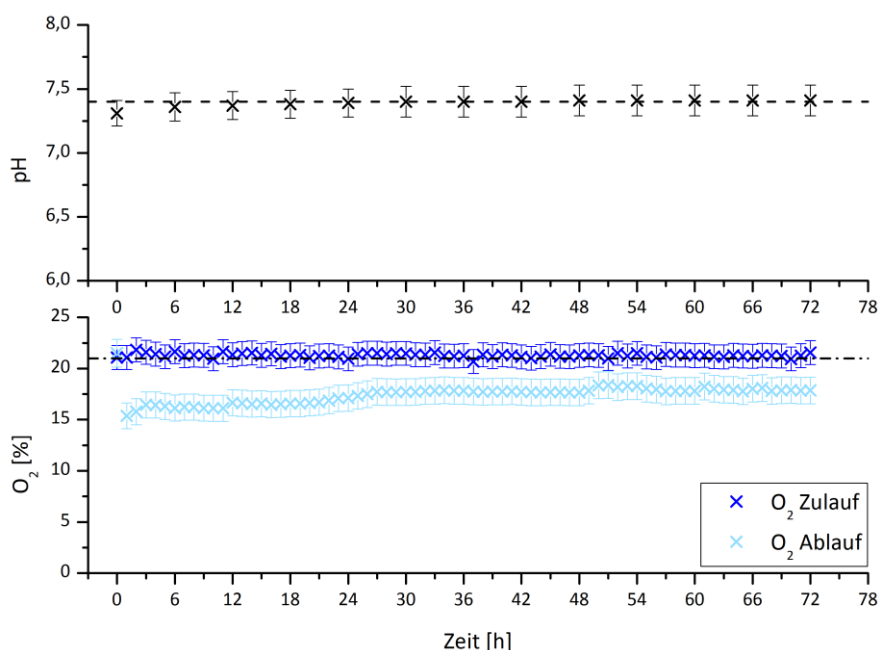
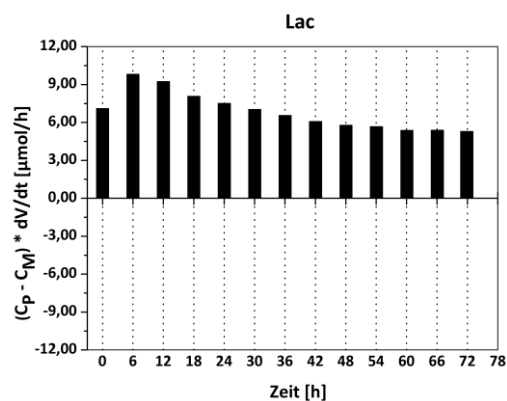
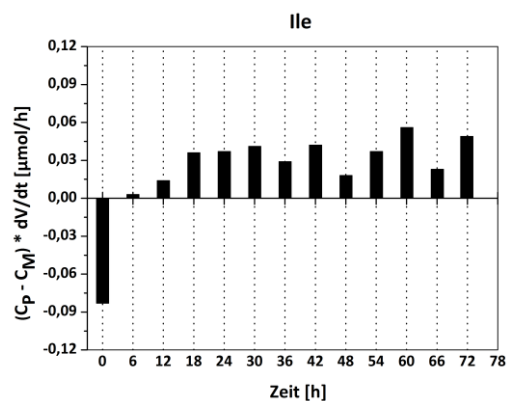
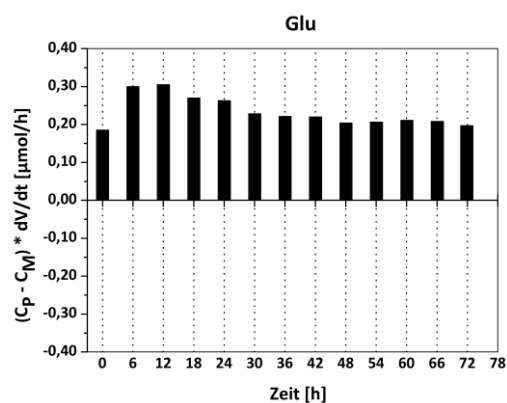
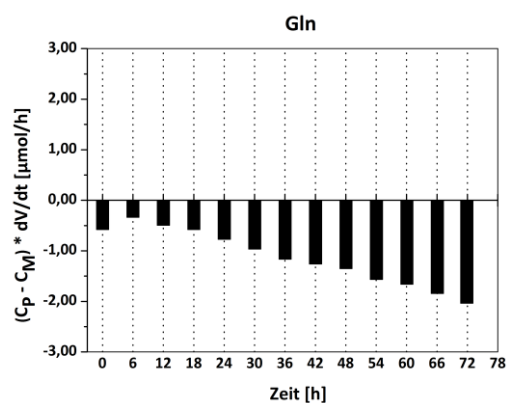
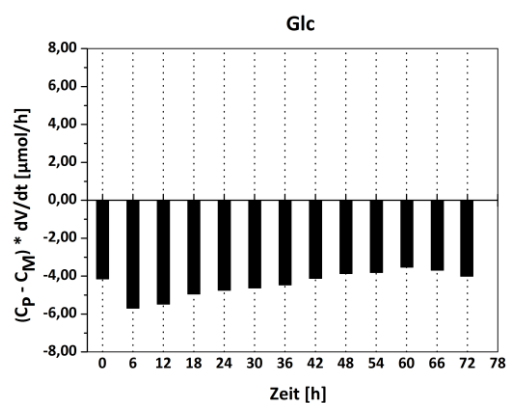
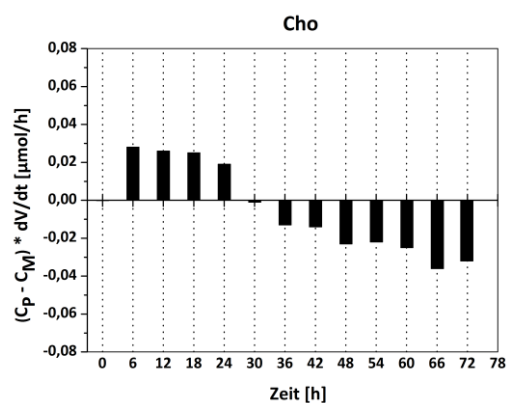


Abbildung 4.27 Verlauf des pH-Wertes in der Perfusionskammer und des Sauerstoffgehaltes im Zu- und Ablauf der Perfusionskammer bei 6 Millionen ReNCX, nach 4-tägiger Behandlung mit dem Antisense Oligonukleotid, unter Perfusion über 72 Stunden und bei normoxischen Bedingungen. **Oben:** Die Einstellung des physiologischen pH-Wertes von 7,4 pH (gestrichelte Linie) erfolgte durch Begasung des Mediums mit 4,0 % CO₂. Die chemische Verschiebung der H^{ε1}-Resonanz des Histidins wurde durch 1D ¹H-NOESY-Spektren bestimmt und in die entsprechenden pH-Werte umgerechnet. **Unten:** Der Sauerstoffgehalt im Zulauf (dunkelblau) wurde durch die Begasung des Mediums mit 21 % O₂ (strichpunktierte Linie) eingestellt. Der reduzierte Sauerstoffgehalt im Ablauf (hellblau) resultierte aus dem Verbrauch der Zellen. Die dargestellten Sauerstoffwerte wurden bei Raumtemperatur gemessen und auf 37 °C zurückgerechnet. Die Messung in der Perfusionskammer fand bei 37 °C, einer Perforationsrate von 100 µl/min und einer Resonanzfrequenz von 800 MHz statt. Für die Darstellung wurde ein Messintervall von 6 Stunden für den pH-Verlauf und ein Messintervall von einer Stunde für den Sauerstoffverlauf gewählt.

Die Untersuchung des metabolischen Verlaufs ergab für Glutamat, Isoleucin, Laktat, Pyro-Glutamat, Pyruvat und Valin höhere Stoffmengen pro Zeit und für Glukose, Glutamin, Phenylalanin und Tyrosin niedrigere Stoffmengen pro Zeit als im Medium enthalten waren. Cholin zeigte als einziger Metabolit ein ambivalentes Verhalten. In der ersten Hälfte war dessen Stoffmenge pro Zeit erhöht und in der zweiten Hälfte vermindert.

Die Metaboliten Glukose und Glutamin wurden, wie erwartet, wieder am stärksten umgesetzt (Abbildung 4.28). Im Auffangbehälter konnte eine Abnahme der Glukose-Konzentration von 0,474 mM und eine Abnahme der Glutamin-Konzentration von 87 µM nachgewiesen werden (Tabelle 4.20). Der Pyruvat-Gehalt änderte sich, wie bei den Zellen ohne Behandlung mit dem Antisense Oligonukleotid, praktisch nicht (+ 1 µM). Im Verlauf in der Perfusionskammer zeigte sich allerdings größtenteils eine höhere Stoffmenge pro Zeit im Vergleich zum Medium auf Grund einer Überlagerung mit Glutamat. Der Glukose-Verbrauch stieg die ersten 6 Stunden auf ein Maximum von 6 % des enthaltenen Zuckers an und fiel dann wieder auf den Ausgangsverbrauch von ca. 4 % ab. Eine genauere Analyse der metabolischen Umsetzung der

Glukose wird in [Kapitel 4.5](#) gegeben. Glutamin zeigte nach einer Abnahme zu Beginn eine kontinuierliche Zunahme des Verbrauchs mit der Zeit. Er betrug zu Beginn der Messung ca. 4 % der vorhandenen Stoffmenge pro Zeit im Medium und gegen Ende ungefähr 15 %.



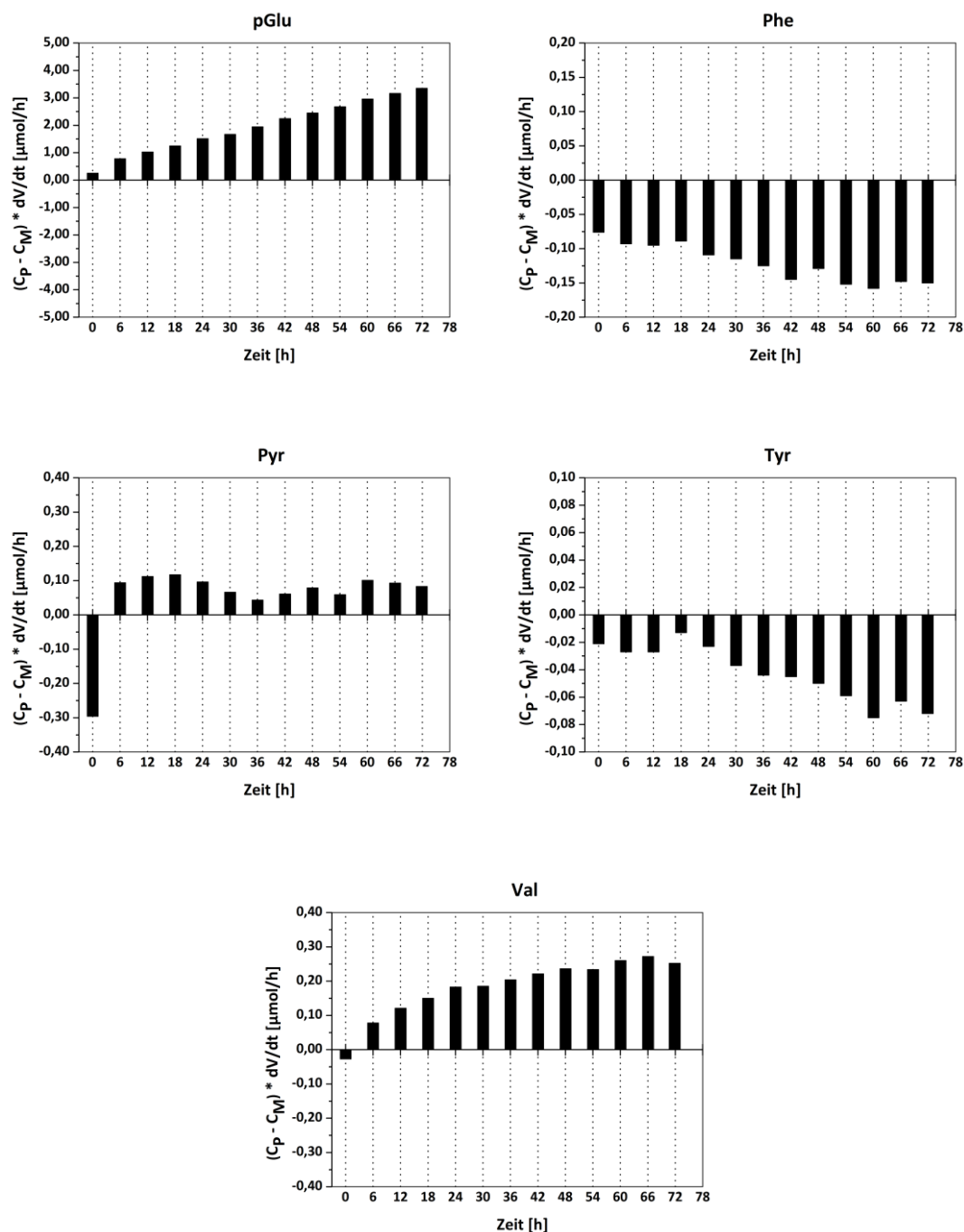


Abbildung 4.28 Zeitlicher Verlauf der Stoffmenge pro Zeit ausgewählter Metaboliten von 6 Millionen ReNCX, nach 4-tägiger Behandlung mit dem Antisense Oligonukleotid, unter Perfusion und normoxischen Bedingungen. Gezeigt ist die Differenz der Konzentration der Metaboliten in der Perfusionskammer (C_p) mit der im Medium enthaltenen Konzentration (C_m) multipliziert mit der eingestellten Perfusionsrate (dV/dt) von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ in 6 Stunden Intervallen. Die Konzentrationen wurden aus 1D ^1H -NOESY-Spektren (11 min Aufnahmezeit, 64 Scans) unter Perfusion, bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz und einer Temperatur von 37 °C über den NMR-Standard DSS bestimmt, dessen Konzentration im Perfusionsmedium 50 μM betrug.

Die Laktat-Synthese spiegelte den Glukoseverlauf wider und erreichte dementsprechend ihr Maximum nach etwa 6 Stunden. Anschließend fiel sie bis zum Ende der Messung kontinuierlich ab. Im Medium konnten in den ca. 432 ml des Mediums im Auffangbehälter 0,551 mM Laktat nachgewiesen werden.

Pyro-Glutamat zeigte die übliche gleichmäßige Zunahme der Stoffmenge pro Zeit im Vergleich zum Medium. Im Auffangbehälter konnte ein Plus von 0,466 mM ermittelt werden. Die Zunahme ist durch die nicht-enzymatischen Umwandlung zu Glutamin zu erklären. Die große Abweichung dieser Konzentration von der Konzentrationsabnahme des Glutamins liegt an der Überlagerung des Glutamin-Verbrauchs mit HEPES. Die Konzentrationsabnahme des Glutamins wäre nach Abzug der Überlagerung folglich deutlich erhöht.

Glutamat zeigte ebenfalls eine im Vergleich zum Medium erhöhte Stoffmenge pro Zeit, mit einem Maximum bei ca. 6 Stunden nach Beginn der Messung. Die Stoffmenge pro Zeit war in diesem Intervall im Vergleich zum ersten Intervall um 65 % erhöht. Im Anschluss fiel der Glutamat-Gehalt bis zum Ende der Messung wieder ungefähr auf den Ausgangswert zurück. Im Auffangbehälter konnte ein Konzentrationsüberschuss von 20 μM ermittelt werden.

Cholin zeigte ein ambivalentes Verhalten im Laufe der Messung. Zu Beginn konnten erhöhte Werte in der Perfusionskammer festgestellt werden, während in der zweiten Hälfte niedrigere Stoffmengen pro Zeit im Vergleich zum Medium ermittelt wurden. Im Auffangbehälter war dagegen eine um 12 μM verminderte Konzentration bestimmt worden. Dies spricht für hauptsächlich intrazelluläre Werte zu Beginn in der Perfusionskammer und einen zunehmenden Verbrauch im Laufe der Messung.

Tabelle 4.20 Stoffmenge pro Zeit und Konzentrationen der untersuchten Metaboliten der Zelllinie ReNCX, nach 4-tägiger Behandlung mit dem Antisense Oligonukleotid, unter Perfusion und bei normoxischen Bedingungen. Die Multiplikation der Konzentration der Metaboliten im Medium (C_M) mit der verwendeten Perfusionsrate (dV/dt) von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ beschreibt die Stoffmenge pro Zeit, welche in der Perfusionskammer ohne Zellen gemessen werden würde. C_P^S ist die tatsächlich gemessene Konzentration der Metaboliten in der Perfusionskammer mit Zellen zu Beginn und C_P^E die Konzentration am Ende der Messung. $C_P^S \cdot dV/dt$ und $C_P^E \cdot dV/dt$ beschreiben dementsprechend die gemessene Stoffmenge pro Zeit in der Perfusionskammer mit Zellen zu Beginn und am Ende der Messung nach 72 Stunden. Die Konzentrationen C_P enthalten sowohl intra- als auch extrazelluläre Anteile. Die Variable C_A ist die Konzentration der Metaboliten im Auffangbehälter nach der Messung. Da C_A nur extrazelluläre Metaboliten enthält, beschreibt die Differenz $C_A - C_M$ die Synthese bzw. den Verbrauch des jeweiligen Metaboliten über die gesamte Messdauer. Für die Bestimmung der Konzentrationen wurden 1D ^1H -NOESY-Spektren unter Perfusion, bei 37 °C und 800 MHz Resonanzfrequenz aufgezeichnet.

Metabolit	$C_M \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	$C_P^S \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	$C_P^E \cdot dV/dt$ [$\mu\text{mol}/\text{h}$]	C_M [mM]	C_A [mM]	$C_A - C_M$ [mM]
Cho	0,360	0,360	0,330	0,060	0,048	- 0,012
Glc	97,794	93,642	93,786	16,299	15,825	- 0,474
Gln	13,962	13,380	11,928	2,327	2,240	- 0,087
Glu	0,282	0,468	0,480	0,047	0,067	+ 0,020
Ile	2,322	2,238	2,370	0,387	0,388	+ 0,001
Lac	0,000	7,098	5,292	0,000	0,551	+ 0,551
pGlu	1,170	1,422	4,524	0,195	0,661	+ 0,466
Phe	1,200	1,122	1,050	0,200	0,191	- 0,009
Pyr	2,772	2,478	2,856	0,462	0,463	+ 0,001
Tyr	1,188	1,164	1,116	0,198	0,196	- 0,002
Val	2,520	2,496	2,772	0,420	0,438	+ 0,018

Die Aminosäuren Isoleucin und Valin zeigten erhöhte Werte, während Phenylalanin und Tyrosin verminderte Stoffmengen pro Zeit im Vergleich zum Medium erkennen ließen. Tendenziell nahm deren Überschuss bzw. Verbrauch im Laufe der Messung zu. Wie auch schon ohne Behandlung mit dem Antisense Oligonukleotid konnte im Medium aus dem

Auffangbehälter hauptsächlich eine Zunahme der Valin-Konzentration (+ 18 μM) festgestellt werden, während Isoleucin mit einem Plus von 1 μM praktisch unverändert blieb. Dies lag an einer Überlagerung des Isoleucins mit der Methylylresonanz der mobilen Lipide. Phenylalanin und Tyrosin zeigten exakt dieselben minimalen Konzentrationsabnahmen wie bei der Messung ohne Behandlung (2 - 9 μM). In der Perfusionskammer konnte in der ersten Hälfte der Messung ein geringerer Verbrauch festgestellt werden, der dann in der zweiten Hälfte bei beiden Metaboliten zunahm.

Eine Auswertung der NMR-sichtbaren Proteine war hier, wie bei den unbehandelten Zellen, nur für die Resonanz bei 2,99 ppm (M7) möglich ([Abbildung 4.29](#)). Es ergab sich ebenfalls ein Anstieg zu Beginn, allerdings war dieser mit einer Zunahme um 67 % stärker ausgeprägt als bei den unbehandelten Zellen. Bis ca. 24 Stunden blieb der Proteingehalt erhöht und nahm dann kontinuierlich bis zum Ende der Messung ab. Der Proteinanteil lag dabei nach 72 Stunden immer noch um 18 % höher als zu Beginn. Der starke Anstieg zu Beginn spricht für eine Zunahme der Proteinsynthese, was auf eine verstärkte Proliferation zu diesem Zeitpunkt deuten könnte.

Die Analyse des Lipidmetabolismus durch die Untersuchung des Verlaufs der Lipidkonzentrationen in diffusionsgewichteten Spektren ergab ein übereinstimmendes Verhalten aller Lipide ([Abbildung 4.29](#)). Nach einem kontinuierlichen Anstieg der Lipidkonzentration für die ersten 36 Stunden zeigte sich eine zunehmende Abflachung des Verlaufs und teilweise gegen Ende sogar eine leichte Abnahme. Die stärkste Zunahme erfuhr dabei die Methylenresonanz ML2 mit einer ca. 4-fachen Erhöhung des Ausgangswertes. Die Lipidkonzentrationen von ML3 und ML6 kamen dem mit einer mittleren 3,5-fachen Erhöhung des Ausgangswertes am nächsten. Die Zunahme der Konzentrationen von ML1, ML4 und ML5 beschränkte sich auf das 2,3 - 3,0-fache der Startkonzentration, wobei ML4 den geringsten Zuwachs verzeichnete.

Überlagerungen mit mobilen Proteinresonanzen waren hier zu jedem Zeitpunkt zu vernachlässigen, da die Lipidkonzentrationen von Beginn an sehr hoch waren. Einflüsse durch extrazelluläre Metaboliten konnten bei der gewählten Diffusionswichtung ebenfalls vernachlässigt werden.

In [Tabelle 4.21](#) wurde der Verlauf der Verhältnisse der Lipidkonzentrationen zur Methylengruppe dargestellt. Dabei zeigte sich zu Beginn ein etwas stärkerer Anstieg der Methylengruppe im Vergleich zu den anderen Lipiden, was durch einen leichten Abfall der Verhältnisse die ersten 30 Stunden deutlich wird. Danach zeigten sich konstante Verhältnisse bis zum Ende der Messung. Der Übergang zu einem nahezu konstanten Verhalten der mobilen Lipide deckt sich mit dem Verhalten des Sauerstoffverbrauchs. Insgesamt zeigten die behandelten neuralen Stammzellen einen um ca. 30 % stärkeren Anstieg der mobilen Lipide im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

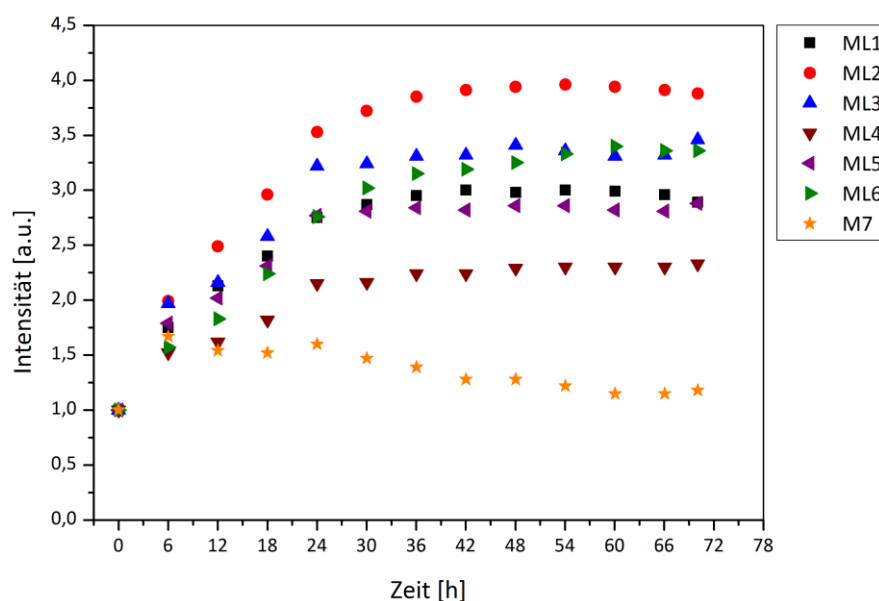


Abbildung 4.29 Verlauf der Integrale der NMR-sichtbaren mobilen Lipide und Proteine der Zelllinie ReNCX, nach 4-tägiger Behandlung mit dem Antisense Oligonukleotid, unter Perfusion und bei normoxischen Bedingungen. Dargestellt sind die Integrale der mobilen Lipide (ML1 - ML6) und der Proteinresonanz M7 in 6 Stunden Intervallen. Die Integrale wurden zur besseren Vergleichbarkeit jeweils auf den Ausgangswert normiert. Grundlage für die Abbildung waren diffusionsgewichtete ^1H -Spektren bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. ML1 ist die Resonanz von Methylgruppen, ML2 ist die Resonanz von Methylengruppen, ML3 und ML5 sind Resonanzen von gesättigten Fettsäuren und ML4 sowie ML6 sind Resonanzen von ungesättigten Fettsäuren. M7 ist die einzige nicht von mobilen Lipiden überlagerte Proteinresonanz bei 2,99 ppm. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: b-Wert = $7,4 \cdot 10^9 \text{ s}/\text{m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = 0,51 T/m. Der Gradient wurde so gewählt, dass die niedermolekularen Anteile abgeschwächt wurden.

Die neuronalen Stammzellen zeigten nach einer 4-tägigen Behandlung mit dem Antisense Oligonukleotid einen ähnlichen metabolischen Verlauf wie die unbehandelten Zellen. Metabolische Unterschiede ergaben sich hauptsächlich bei den makromolekularen Resonanzen. Durch die Analyse der Proteinresonanz M7 konnte eine über doppelt so große Zunahme des Proteinanteils zu Beginn bei den behandelten Zellen festgestellt werden. Die mobilen Lipide zeigten vom Verlauf und dem Verhältnis untereinander ein relativ identisches Verhalten. Lediglich die Methingruppe (ML6) zeigte im behandelten Fall einen etwas stärkeren Anstieg und war dem Anstieg der Methylengruppe sehr ähnlich. Der größte Unterschied waren die um 30 % höheren Zunahmen der mobilen Lipidresonanzen im Vergleich zum unbehandelten Fall. Die Analyse des Sauerstoffverbrauchs wies eine deutliche Abnahme des Verbrauchs bis etwa 30 Stunden (-1,4 % O_2) auf, gefolgt von einem relativ konstanten Sauerstoffverbrauch bis zum Ende. Die Berechnung der vitalen Zellen sowie der Gesamtzellzahl am Ende der Messung über die Sauerstoffverbrauchsrates zeigte eine geringere Zunahme der Gesamtzellzahl und eine größere Abnahme des Anteils der vitalen Zellen als im unbehandelten Fall.

Tabelle 4.21 Verlauf der Verhältnisse der mobilen Lipide der Zelllinie ReNCX in Relation zu ML2, nach 4-tägiger Behandlung mit dem Antisense Oligonukleotid, unter Perfusion und bei normoxischen Bedingungen. Für die Verhältnisse zu ML2 wurden diffusionsgewichtete ^1H -Spektren bei 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ in einem Intervall von 6 Stunden verwendet. ML1 ist die Resonanz von Methylgruppen, ML2 ist die Resonanz von Methylengruppen, ML3 und ML5 sind Resonanzen von gesättigten Fettsäuren und ML4 sowie ML6 sind Resonanzen von ungesättigten Fettsäuren. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: b-Wert = $7,4 \cdot 10^9 \text{ s}/\text{m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = $0,51 \text{ T}/\text{m}$.

Zeit [h]	ML6	ML5	ML4	ML3	ML2	ML1
0	0,11	0,18	0,26	0,15	1,00	0,24
6	0,08	0,16	0,20	0,15	1,00	0,21
12	0,08	0,14	0,17	0,13	1,00	0,20
18	0,08	0,14	0,16	0,13	1,00	0,19
24	0,08	0,14	0,16	0,14	1,00	0,18
30	0,09	0,13	0,15	0,13	1,00	0,18
36	0,09	0,13	0,15	0,13	1,00	0,18
42	0,09	0,13	0,15	0,13	1,00	0,18
48	0,09	0,13	0,15	0,13	1,00	0,18
54	0,09	0,13	0,15	0,13	1,00	0,18
60	0,09	0,13	0,15	0,13	1,00	0,18
66	0,09	0,13	0,15	0,13	1,00	0,18
70	0,09	0,13	0,15	0,13	1,00	0,18

4.5 Analyse des Glukose- und Glutamin-Metabolismus

Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, sind Glukose und Glutamin zwei bedeutende Metaboliten im Zellstoffwechsel. Aus diesem Grund wurde zum einen die Umsetzung der Metaboliten Glukose und dem Zwischenprodukt Pyruvat zu Laktat in den zuvor beschriebenen Experimenten analysiert. Zum anderen wurde untersucht in welchem Umfang der Metabolit Glutamin zu Pyro-Glutamat umgewandelt wurde und welcher Anteil der verbrauchten Glutamin-Konzentration in den Stoffwechsel der Zellen involviert war. Das von den Zellen verbrauchte Glutamin und der Anteil an zu Laktat umgewandelter Glukose gab dabei prinzipiell Aufschluss darüber, ob sich die Zellen eher in einem proliferativen oder quieszenten Zustand befanden.

Ein hoher Glukose-Verbrauch der Tumorzellen zeigte sich bereits bei der Analyse des zur Kultivierung der humanen Glioblastom Zelllinie HTZ-349 verwendeten Mediums. Bei 500.000 ausgesäten Zellen in einer T75 Zellkulturflasche mit 10 ml Medium unter proliferativen Bedingungen zeigte sich eine Reduktion der Glukosekonzentration innerhalb der ersten 24 Stunden auf 77 % des Ausgangswertes. 48 Stunden später waren nur noch 45 % der Glukose enthalten. Nach 72 Stunden hatte sich die anfängliche Zellzahl vervierfacht und der Glukosegehalt sank auf lediglich 2 %.

Für die Perfusionsmessungen wurden die Zellen mit Medium ohne Serum untersucht, welches für die Proliferation der Zellen notwendig wäre, da das Serum unter Perfusion eine starke Schaumbildung im System verursacht hätte. Deswegen war davon auszugehen, dass sich die Zellen während einer Perfusionsmessung in einem Zustand der Quieszenz befanden, oder im Laufe der Messung in einen solchen Zustand übergingen. Aus diesem Grund wurde überprüft, wie groß der Anteil der zu Laktat umgesetzten Glukose war. Da aus einem Molekül Glukose durch die Glykolyse zwei Moleküle Pyruvat gebildet werden, welche dann zu insgesamt zwei Molekülen Laktat umgewandelt werden können, wurden die gesamten Konzentrationsänderungen von Glukose $\Delta c(Glc)$, Pyruvat $\Delta c(Pyr)$ und Laktat $\Delta c(Lac)$ aus dem Vergleich der jeweiligen Konzentration aus dem Auffangbehälter und von frischem Medium unter Berücksichtigung der Vorzeichen (je nach Synthese oder Verbrauch) addiert ([Gleichung 4.1](#)).

$$\sum \Delta c(Glc, Pyr, Lac) = 2 \cdot \Delta c(Glc) + \Delta c(Pyr) + \Delta c(Lac) \quad (4.1)$$

Bei einer vollständigen Umwandlung der vorhandenen Konzentrationen an Glukose und Pyruvat zu Laktat würde sich die Summe der Konzentrationsänderungen $\sum \Delta c(Glc, Pyr, Lac)$ dementsprechend genau aufheben. Negative Werte würden auf eine zusätzliche Verbrauchsquelle von Glukose und Pyruvat außer der Laktat-Synthese hindeuten. Zur Berücksichtigung der Perfusionsrate wurde die Summe der Konzentrationsänderungen zusätzlich mit den 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ multipliziert. Daraus ergab sich dann die Summe der Stoffmengenänderungen pro Zeit, welche in der Perfusionskammer im Vergleich zum Medium gemessen wurden. Mit dieser Methode wurde ermittelt, dass im Fall ohne Perfusion 89 - 98 % und unter Perfusion bei normoxischen Bedingungen 60 - 78 % der vorhandenen Glukose zu Laktat umgewandelt wurden, je nach zusätzlicher Umwandlung des im Medium vorhandenen Pyruvats.

Im zeitlichen Verlauf zeigte die Summe des Glukose- und Pyruvat-Verbrauchs aus dem Medium mit der Laktat-Synthese vor allem in den ersten 6 Stunden deutlich negative Werte ([Abbildung 4.30 A](#)), wodurch ein Überschuss auf Seiten des Glukose- und Pyruvat-Verbrauchs beschrieben wurde. Dementsprechend wurden die verbrauchten Metaboliten Glukose und Pyruvat nicht vollständig zu Laktat umgewandelt. Nach diesen 12 Stunden zeigte sich tendenziell ein ausgeglichenes Verhältnis, also eine Summe nahe Null, welche eine fast vollständige Umwandlung der Metaboliten Glukose und Pyruvat zu Laktat andeutete.

Im Medium der neuralen Stammzelllinie ReNCX waren Wachstumsfaktoren enthalten, weswegen hier von einem stärkeren Beitrag des Metaboliten Glukose zum Anabolismus der Zellen auszugehen war, als bei den Tumorzellen. Außerdem war die Umsetzung von Glukose zu Laktat bei Tumorzellen auf Grund des Warburg-Effekts selbst bei normoxischen Bedingungen erhöht. Insgesamt zeigten die unbehandelten Zellen der Zelllinie ReNCX einen Anteil der zu Laktat umgesetzten Glukose von 66 %. Im Falle der Vorbehandlung der neuralen Stammzellen mit dem Antisense Oligonukleotid wurden nur 58 % der verbrauchten Glukose zu Laktat synthetisiert. Das im Medium enthaltene Pyruvat wurde bei den Perfusionsmessungen mit den neuralen Stammzellen nicht verbraucht.

Im zeitlichen Verlauf wird deutlich, dass bei den neuronalen Stammzellen sowohl im mit Antisense Oligonukleotid behandelten Fall als auch ohne Behandlung, über die gesamte Dauer von 72 Stunden, im Vergleich zu den Tumorzellen, mehr Glukose für andere Prozesse als der Laktat-Synthese verwendet wurde (**Abbildung 4.30 B und C**). Zudem ließ sich eine Periodizität der derartig verwendeten Glukose- und Pyruvat-Stoffmenge pro Zeit mit einer Periodendauer von 36 Stunden erkennen. Die Periode ist dabei im Vergleich der beiden Stoffmengenverläufe um 180° phasenverschoben.

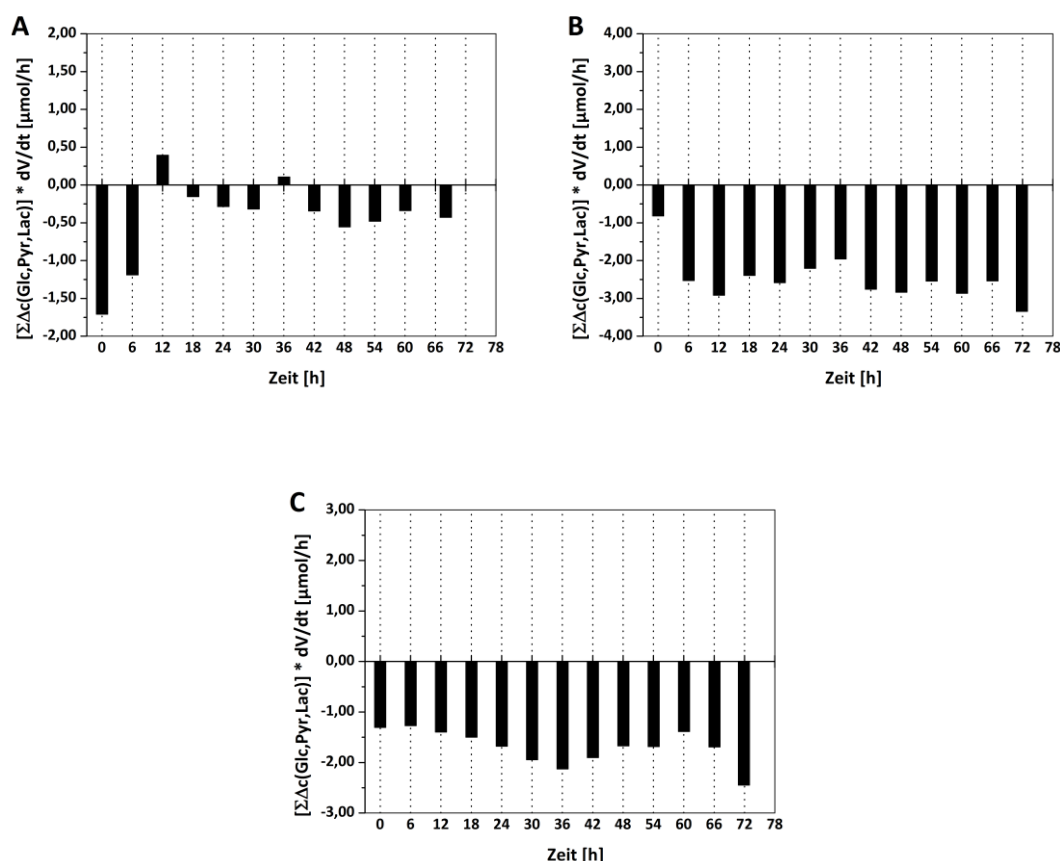


Abbildung 4.30 Verlauf der Summe der Konzentrationsänderungen der verbrauchten Metaboliten Glukose und Pyruvat mit der Synthese des Metaboliten Laktat von 6 Millionen Zellen der Zelllinie HTZ-349 und ReNCX multipliziert mit der Perfusionsrate unter normoxischen Bedingungen. Die Summe der doppelten Konzentrationsänderung der Glukose mit der einfachen Konzentrationsänderung des Pyruvats sowie des Laktats hebt sich auf Grund der Umwandlung von einem Molekül Glukose zu zwei Molekülen Pyruvat und schließlich zwei Molekülen Laktat bei einer vollständigen Umwandlung zu Laktat komplett auf. Negative Werte der Summe deuten eine zusätzliche Verbrauchsquelle von Glukose und Pyruvat außer der Laktat-Synthese an. Zur Berücksichtigung der Perfusionsrate von 100 μl/min wurde die Summe der Konzentrationsänderungen mit dieser multipliziert. Daraus ergab sich letztlich eine Summe der entsprechenden Stoffmengenänderungen pro Zeit, welche in der Perfusionskammer im Vergleich zum Medium gemessen wurden. **A)** Summe der Stoffmengenänderungen pro Zeit für 6 Millionen Zellen der Zelllinie HTZ-349 unter normoxischen Bedingungen. **B)** Verlauf der Summe der Stoffmengenänderungen pro Zeit für 6 Millionen Zellen der Zelllinie ReNCX unter normoxischen Bedingungen. **C)** Verlauf der Summe der Stoffmengenänderungen pro Zeit von 6 Millionen Zellen der neuronalen Stammzelllinie ReNCX, welche für 4 Tage mit 10 μM des Antisense Oligonukleotids behandelt wurden. Die Grundlage für diese Abbildungen waren jeweils 1D ¹H-NOESY-Spektren von Perfusionsmessungen bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 μl/min.

Die Analyse welcher Anteil der Abnahme der Glutamin-Konzentration auf eine spontane Umwandlung zu Pyro-Glutamat zurückzuführen war, zeigte im Fall der Zelllinie HTZ-349 unter

normoxischen Bedingungen, dass insgesamt 90 % des verbrauchten Glutamins zu Pyro-Glutamat umgewandelt wurden. Nur 10 % des Glutamins waren demnach von den Zellen für den Zellmetabolismus verwendet worden. Der zeitliche Verlauf der Summe der Konzentrationsänderungen $\Sigma\Delta c(pGlu, Gln)$ (Gleichung 4.2), multipliziert mit der Perfusionsrate, unter Berücksichtigung des jeweiligen Vorzeichens von Pyro-Glutamat $\Delta c(pGlu)$ und Glutamin $\Delta c(Gln)$, zeigte nach einem Abfall in den ersten 6 Stunden eine tendenzielle Zunahme der Stoffmenge pro Zeit über den Zeitraum der restlichen Messung (Abbildung 4.31 A). Dies deckte sich mit der Analyse des Glukose-Metabolismus und zeigte, dass insgesamt betrachtet vor allem die ersten 6 Stunden Glutamin von den Zellen verbraucht wurde, während der Anteil des Glutamins, welcher spontan zu Pyro-Glutamat umgewandelt wurde, im Laufe der Messung zunahm.

$$\sum \Delta c(pGlu, Gln) = \Delta c(pGlu) + \Delta c(Gln) \quad (4.2)$$

Im zeitlichen Verlauf bei saurem pH-Wert zeigte sich, dass deutlich weniger Glutamin von den Zellen verbraucht wurde als in der physiologischen Phase (Abbildung 4.31 B). Insgesamt wurden 98 % des verbrauchten Glutamins zu Pyro-Glutamat umgewandelt und nur 2 % von den Zellen umgesetzt. Dabei zeigte der Verlauf der Stoffmenge pro Zeit, dass hauptsächlich während der physiologischen Phase Glutamin durch die Zellen aufgenommen wurde. In den sauren Phasen hatte sich Glutamin zum größten Teil zu Pyro-Glutamat umgewandelt.

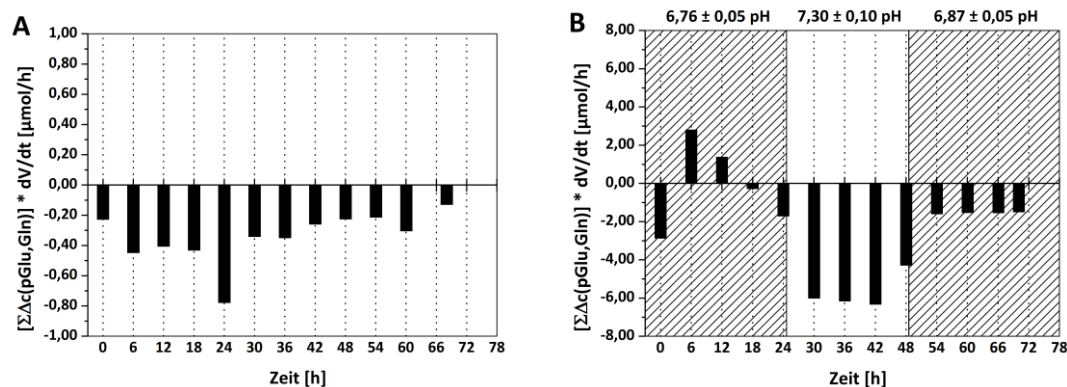


Abbildung 4.31 Verlauf der Summe der Konzentrationsänderungen des verbrauchten Glutamins mit der Synthese des Pyro-Glutamats von 6 Millionen Zellen der Zelllinie HTZ-349 multipliziert mit der Perfusionsrate unter normoxischen Bedingungen und unter pH-Stress. Pyro-Glutamat wird unter den Bedingungen der durchgeführten Perfusionsmessungen spontan aus Glutamin gebildet. Dieser Effekt ist unabhängig vom Zellmetabolismus. Die Summe der Konzentrationsänderungen des Glutamins und des Pyro-Glutamats deckt auf, welcher Anteil des Glutamins ohne Beteiligung der Zellen zu Pyro-Glutamat umgewandelt wurde. Zur Berücksichtigung der Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l/min}$ wurde die Summe der Konzentrationsänderungen mit dieser multipliziert. Daraus ergab sich letztlich eine Summe der entsprechenden Stoffmengenänderungen pro Zeit, welche in der Perfusionskammer im Vergleich zum Medium gemessen wurden. **A)** Zeitlicher Verlauf der Summe der Stoffmengenänderungen pro Zeit für 6 Millionen Zellen der Zelllinie HTZ-349 unter normoxischen Bedingungen. **B)** Verlauf der Summe der Stoffmengenänderungen pro Zeit für 6 Millionen HTZ-349 unter pH-Stress. Bis zu 24 Stunden wurden die Zellen unter sauren Bedingungen untersucht (schraffiert), anschließend wurden die Zellen weitere 24 Stunden mit physiologischem Medium versorgt und in den letzten 24 Stunden wurde der pH-Wert wieder in den sauren Bereich verschoben (schraffiert). Die Grundlage für diese Abbildungen waren jeweils 1D ^1H -NOESY-Spektren von Perfusionsmessungen bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l/min}$.

4.6 Analyse des Sauerstoffverbrauchs und Korrelation mit der Zellvitalität

Der Sauerstoffverbrauch der Zellen $\Delta O_2(t)$ konnte durch den Sauerstoffsensor im Ablauf der Perfusionskammer während einer Messung detektiert und aufgezeichnet werden. Zusammen mit der Bestimmung der Anzahl an lebenden Zellen $N_l(t)$ zu Beginn und am Ende einer Messung konnte über [Gleichung 4.3](#) die Sauerstoffverbrauchsrate $SVR(t)$ zu diesen beiden Zeiten bestimmt werden.

$$SVR(t) = \frac{\Delta O_2(t)}{N_l(t)} \quad (4.3)$$

Bei einer über die Perfusionsmessung gleichbleibenden Sauerstoffverbrauchsrate konnte dann über dessen Mittelwert SVR^* und durch [Gleichung 4.4](#) zusammen mit dem gemessenen Sauerstoffverbrauch $\Delta O_2(t)$ die Anzahl an lebenden Zellen $N_l(t)$ in der Perfusionskammer zu jedem Zeitpunkt bestimmt werden. Durch Relation zur gesamten Anzahl an eingebetteten Zellen N_{ges} , konnte somit die prozentuale Zellvitalität im zeitlichen Verlauf dargestellt werden.

$$\frac{N_l(t)}{N_{ges}} = \frac{\Delta O_2(t) \cdot SVR^{*-1}}{N_{ges}} \quad (4.4)$$

In [Abbildung 4.32 A](#) ist der Verlauf der Zellvitalität einer Perfusionsmessung mit 6 Millionen Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 unter Variation des pH-Wertes dargestellt. SVR^* betrug in diesem Fall $1,5 \pm 0,1 \text{ \% } O_2 / 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen}$. Während der physiologischen Phase in den ersten 21 Stunden sank der Sauerstoffverbrauch und damit die Zellvitalität linear ([Abbildung 4.32 B](#)). In den darauffolgenden sauren (7,0 pH) und basischen Phasen (8,7 pH) jedoch zeigte sich eine Beschleunigung des Abfalls der Zellvitalität ([Abbildung 4.32 C und D](#)). In beiden Fällen ergaben sich gute Fitergebnisse mit einem Polynom 2. Ordnung. Die berechnete Zellvitalität wich von dem tatsächlich ermittelten Anteil an lebenden Zellen nur um 2 % ab.

Die Abschätzung der Zellvitalität aus der Sauerstoffverbrauchsrate ist trotzdem nur eine Näherung des tatsächlichen Anteils an lebenden Zellen. Dies liegt unter anderem daran, dass sich die Sauerstoffverbrauchsrate von Zellen im Laufe einer Messung auch ändern kann. Die mittlere Sauerstoffverbrauchsrate betrug bei Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 $1,8 \pm 0,4 \text{ \% } O_2 / 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen}$ ($n = 12$) ($= 18,1 \text{ } \mu\text{mol } O_2 / (l \cdot 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen})$) und bei der neuronalen Stammzelllinie ReNCX $1,0 \pm 0,2 \text{ \% } O_2 / 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen}$ ($n = 2$) ($= 10,0 \text{ } \mu\text{mol } O_2 / (l \cdot 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen})$). Bei Perfusionsmessungen unter physiologischen Bedingungen blieb die SVR mit einer

mittleren Abweichung von 6 % weitestgehend konstant, während die SVR unter Stressbedingungen im Verlauf mit mittleren 26 % eine deutlich größere Abweichung aufwies. Tendenziell stieg die SVR unter pH-Stress an, während unter Hypoxie bzw. nach einer hypoxischen Phase ein abfallender Verlauf verzeichnet wurde. Die Abschätzung der Zellvitalität wird mit einer zunehmenden Veränderung der Verbrauchsrate im Laufe einer Messung ungenauer. Bei einer nahezu gleichbleibenden Sauerstoffverbrauchsrate stimmt die berechnete Zellvitalität mit der tatsächlich ermittelten Vitalität jedoch gut überein, wie hier gezeigt werden konnte.

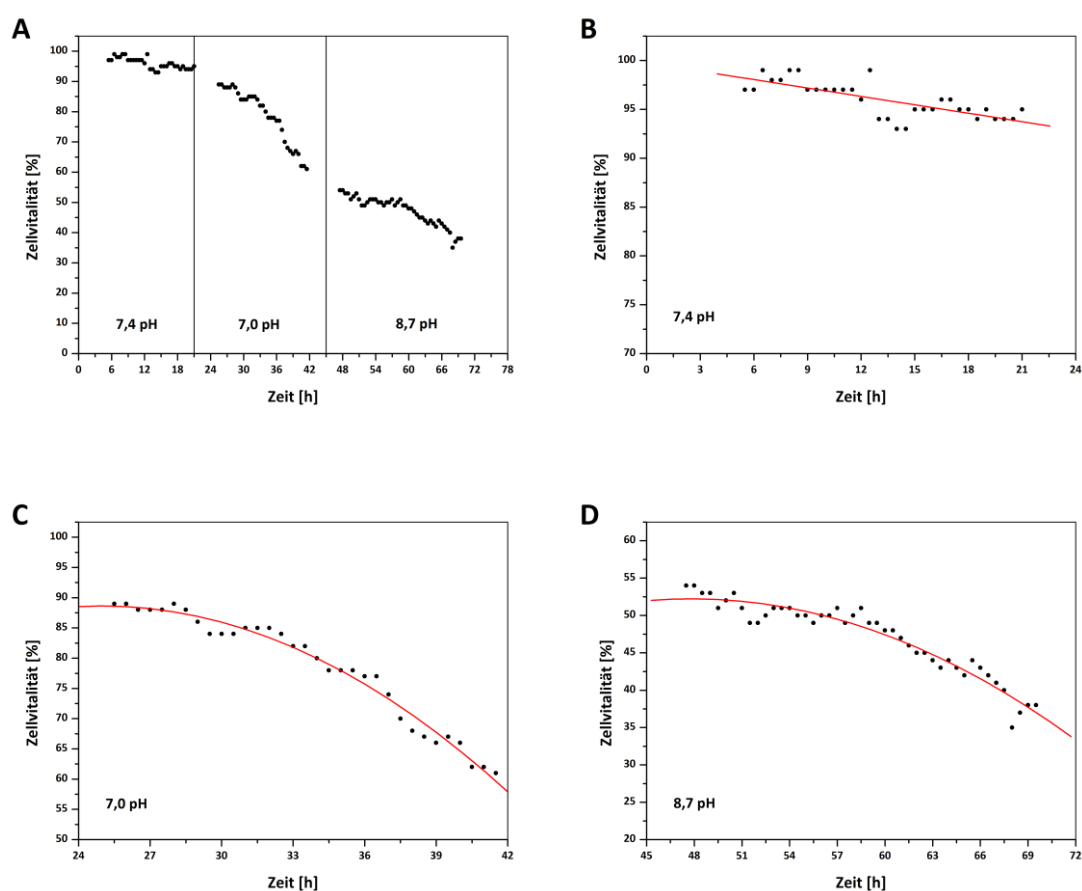


Abbildung 4.32 Verlauf der Zellvitalität bei Perfusionmessungen mit 6 Millionen Zellen der Zelllinie HTZ-349 unter verschiedenen pH-Werten. **A)** Gesamter Verlauf der Zellvitalität einer Perfusionmessung mit drei verschiedenen Phasen. Beeinflussungen der Zellvitalität durch Veränderung des Sauerstoffverbrauchs wegen Gasblasen wurden entfernt. **B)** In den ersten 21 Stunden wurden die Zellen unter physiologischen Bedingungen untersucht. Die Zellvitalität zeigte eine lineare Abnahme. **C)** In den nächsten 24 Stunden wurde der pH-Wert in den für die Zellen sauren Bereich verschoben (7,0 pH). Die Zellvitalität zeigte eine beschleunigte Abnahme (Polynom zweiter Ordnung). **D)** In der letzten Phase wurde der pH-Wert in den basischen Bereich verschoben (8,7 pH). Die Zellvitalität nahm ebenfalls beschleunigt ab, allerdings nicht so stark wie in der zweiten Phase. Grundlage für die Darstellung der Zellvitalität war die zuvor ermittelte mittlere Sauerstoffverbrauchsrate von $1,5 \text{ \% O}_2 / 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen}$ sowie der gemessene Sauerstoffverbrauch. Der Determinationskoeffizient der Fits lag zwischen 0,75 und 0,98.

4.7 Analyse und Charakterisierung der mobilen Proteine der Zelllinie HTZ-349 mittels ^{15}N -Markierung

Protein- und Lipidresonanzen haben, wie auch intrazelluläre Metaboliten, auf Grund einer Einschränkung der Beweglichkeit durch zelluläre Kompartimente eine große rotatorische Korrelationszeit und eine damit verbundene kleinere transversale Relaxationszeit T_2 . Durch Verwendung von Diffusions- und T_2 -gewichteten Pulsprogrammen war es möglich die beweglicheren extrazellulären Metaboliten von den eingeschränkt mobilen intrazellulären Metaboliten zu trennen (**Abbildung 4.33**). Aufgrund der reziproken Proportionalität der transversalen Relaxationszeit zur Linienbreite der Resonanzen wiesen intrazelluläre Metaboliten eine größere Linienbreite auf als extrazelluläre Substanzen. Daher war zu erwarten, dass intrazelluläre Metaboliten, wie zum Beispiel die NMR-sichtbaren Proteine und Lipide, mit einer hohen Wahrscheinlichkeit überlappen beziehungsweise überlagert sind, wodurch vor allem die Auswertung der mobilen Proteine, auf Grund deren geringeren Signalintensität im Vergleich zu den Lipiden, erschwert wurde.

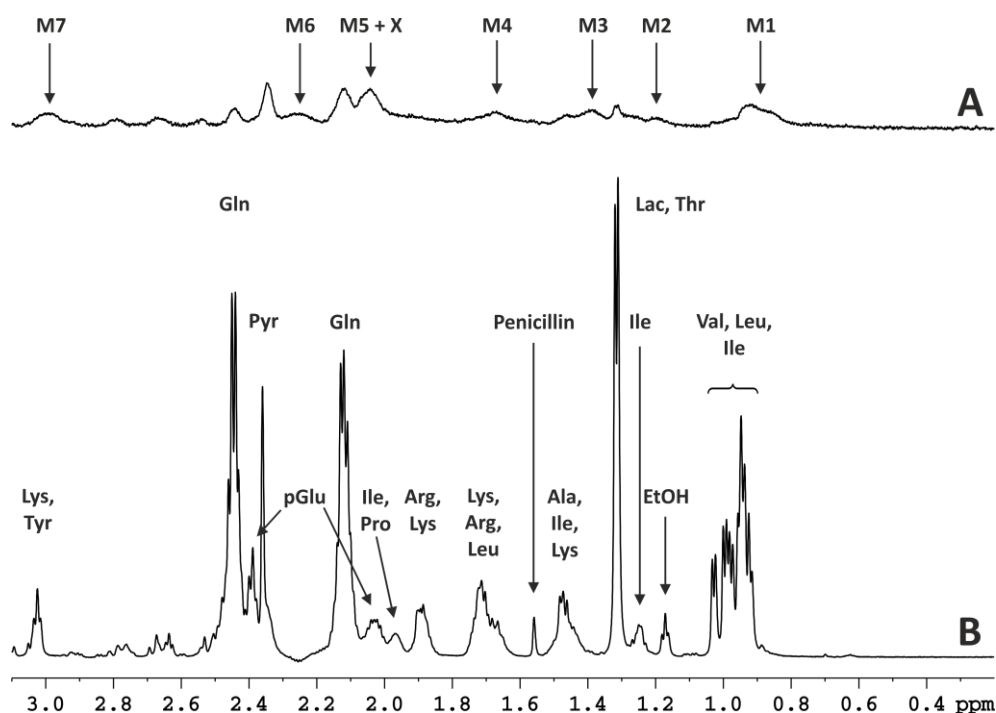


Abbildung 4.33 Diffusions- und T_2 -Wichtung von 6 Millionen Zellen der Zelllinie HTZ-349 unter Perfusion. **A)** Das diffusionsgewichtete Spektrum zeigt hauptsächlich intrazelluläre Resonanzen von den mobilen Proteinen (M1 - M7). M5 ist hier noch durch die extrazellulären Metaboliten Pyro-Glutamat und Glutamin überlagert (M5 + X), welche auf Grund ihrer hohen Konzentration bei der verwendeten Wichtung noch nicht ausreichend abgeschwächt waren. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: b-Wert = $7,4 \cdot 10^9 \text{ s/m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = $0,51 \text{ T/m}$. **B)** Im T_2 -gewichteten Spektrum sind nur noch extrazelluläre Resonanzen aus dem Medium und Stoffwechselprodukte, wie z.B. Laktat und Glutamin, sichtbar. Das verwendete Pulsprogramm war eine T_2 -Wichtung nach Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) mit einer zusätzlichen Wasserunterdrückung mittels „Excitation Sculpting“ bei einer Echozeit von 300 ms, d.h. es wurden 300 180° -Pulse bei einem Pulsabstand von 1 ms angelegt. Beide Spektren wurden bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37°C und einer Perfusionsrate von $100 \mu\text{l/min}$ aufgezeichnet. Die gezeigten Spektren wurden auf DSS bei 0,00 ppm geeicht.

Wie in [Kapitel 4.2](#) beschrieben waren die Resonanzen der NMR-sichtbaren Proteine meist nur zu Beginn einer Perfusionsmessung im Spektrum sichtbar, da im Verlauf der Messung die Konzentrationen der mobilen Lipide stark zunahmen, wodurch die meisten Proteinresonanzen letztlich verdeckt wurden. Lediglich die Proteinresonanz M7 wurde im Falle der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 nicht von mobilen Lipiden überdeckt. Deren Verlauf zeigte über 3 Tage keine Veränderung im Falle ohne Perfusion und eine kontinuierliche Abnahme des Proteingehalts um etwa 44 % unter normoxischen Bedingungen. Unter pH-Stress sank die Konzentration von M7 insgesamt um ca. 53 % ab und zeigte tendenziell eine leichtes abflachen in der physiologischen Phase. Unter Hypoxie konnte bei der Proteinresonanz M7 keine Einflussnahme auf den Konzentrationsverlauf nachgewiesen werden. Insgesamt verringerte sich der Proteingehalt im Laufe der Messung um 50 %.

Auf Grund der geringen Intensität der NMR-sichtbaren mobilen Proteine und deren Überlagerung mit intrazellulären Resonanzen wurden, wie in [Kapitel 3.2.2](#) beschrieben, Zellen der Zelllinie HTZ-349 im Standardmedium mit einem Zusatz von ^{15}N -markierten Aminosäuren kultiviert um damit eine erste Charakterisierung der mobilen Proteine über eine proteinspezifische Aminosäuresequenz zu ermitteln. Die Kultivierung über eine Zellpassage (5 Tage) bei einer Konzentration von 3 mg/ml der Isotopen-markierten Aminosäuren erwies sich als optimal für die Signalausbeute der markierten Proteine im HSQC (Hetero Single Quantum Coherence) Spektrum. Bei kürzerer sowie auch bei längerer Kultivierung in ^{15}N -markiertem Medium wurden weniger Signale im HSQC-Spektrum detektiert.

In [Abbildung 4.34](#) sind die HSQC-Spektren von 9 Millionen HTZ-349 nach einer 5-tägigen Kultivierung im Isotopen-markierten Medium (blau) sowie das Spektrum des ^{15}N -markierten Mediums (rot) dargestellt. Bis auf eine Resonanz bei $\delta^{\text{HN}} = 7,62 \text{ ppm}$ und $\delta^{\text{N}} = 131,11 \text{ ppm}$ ergaben sich keine weiteren Überlappungen zwischen den beiden Spektren. Dieser klaren Aufteilung durch eine Veränderung der chemischen Verschiebung sowohl auf der Protonen- als auch auf der Stickstoffachse liegt eine Umbildung der chemischen Umgebung der Aminosäuren durch den Einbau in die Proteinstruktur über Peptidbindungen zu Grunde. Deswegen wurden chemische Verschiebungen aus Modelpeptiden, wie Tetrapeptiden ($\text{Ac-Gly-Gly-X-Ala-NH}_2$) [Koehler et al. 2012; Koehler 2014] und Hexapeptiden ($\text{Ac-Gly-Gly-X-Ala-Gly-Gly-NH}_2$ und $\text{Ac-Gly-Gly-X-Pro-Gly-Gly-NH}_2$) [Wishart et al. 1995], sowie die „Biological Magnetic Resonance Data Bank“ (BMRB) [Ulrich et al. 2008] zum Vergleich benutzt um die potenziellen Beiträge zu den Proteinresonanzen in den diffusionsgewichteten 1D ^1H -Spektren sowie die am stärksten ausgeprägten Resonanzen in den ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren zuzuordnen.

Im Einklang mit Ergebnissen von Behar & Ogino [Behar & Ogino 1993] zeigten die H^γ - und H^δ -Resonanzen der Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin in den 1D Spektren Beiträge zu M1 (0,87 ppm + 0,92 ppm). Die Proteinresonanz M2 (1,20 ppm) war hauptsächlich auf die H^γ -Protonen des Threonins zurückzuführen, aber auch H^γ -Anteile des Isoleucins fielen in diesen spektralen Bereich. Das Proteinsignal M3 (1,39 ppm) lag im Bereich der H^β -Resonanz des Alanins. Die H^δ -Protonen des Lysins, die H^β - und H^γ -Protonen des Leucins und die H^γ -Protonen des Arginins bildeten die Proteinresonanz M4 (1,68 ppm). Die Proteinresonanz M5 (2,04 ppm) wurde hauptsächlich von H^β -Protonen der Aminosäuren Glutamin, Glutamat, Methionin, Prolin und Valin gebildet. Zudem spielten auch die H^γ -Protonen des Prolins und die H^ϵ -Protonen des Methionins eine Rolle. Die H^β -Protonen des Prolins sowie die H^γ -Protonen des

Glutamats lieferten Beiträge zur Proteinresonanz M6 (2,26 ppm). Das Proteinsignal M7 (2,99 ppm) wurde schließlich durch die H^{ϵ} -Protonen des Lysins sowie von Beiträgen durch die H^{β} -Protonen der Aminosäuren Tyrosin, Cystein und Phenylalanin gebildet. Die Aminosäuren Glutamin, Cystein, Asparagin und Tryptophan waren im verwendeten Medium nicht ^{15}N -markiert (Abbildung 3.5). Bei Glutamin, Cystein und Asparagin handelt es sich allerdings um nicht essentielle Aminosäuren, damit könnten diese in den Zellen aus ^{15}N -markiertem Glutamat, Methionin und Aspartat gebildet worden sein. Lediglich Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure und konnte damit nicht im 1H - ^{15}N -HSQC Spektrum detektiert werden.

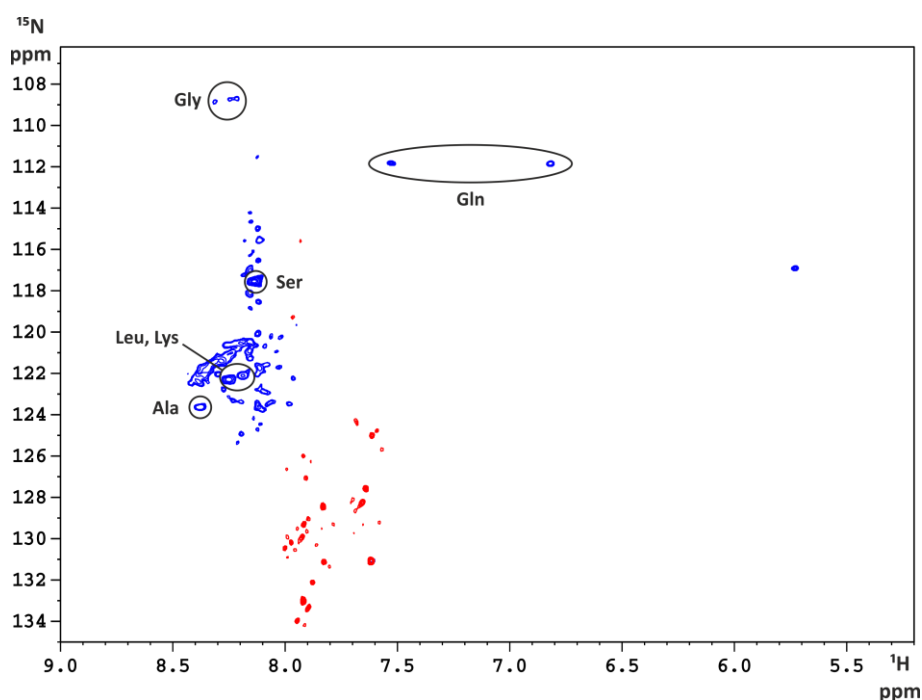


Abbildung 4.34 1H - ^{15}N -HSQC Spektren der ^{15}N -markierten Aminosäuren und von 9 Millionen HTZ-349 Zellen nach 5-tägiger Kultivierung mit zusätzlich 3 mg/ml der Isotopen-markierten Aminosäuren. Dargestellt ist eine Überlagerung zweier HSQC-Spektren von 3 mg/ml ^{15}N -markierten Aminosäuren in PBS (rot) und 9 Millionen Zellen der Zelllinie HTZ-349 nach einer Zellpassage im Isotopen-markierten Medium (blau). Durch Vergleiche mit chemischen Verschiebungen von Tetra- und Hexapeptiden [Koehler et al. 2012; Koehler 2014; Wishart et al. 1995] sowie der „Biological Magnetic Resonance Data Bank“ (BMRB) [Ulrich et al. 2008] konnten die markanten Resonanzen den Aminosäuren Alanin, Leucin, Lysin, Serin, Glycin und Glutamin zugeordnet werden. Die Spektren wurden bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz und einer Temperatur von 37 °C aufgezeichnet. Die Daten wurden mit einem Gauss-Filter bei einer negativen Linienverbreiterung von -20 Hz prozessiert.

In Tabelle 4.22 sind die möglichen Zuordnungen zu den in Abbildung 4.34 markierten Resonanzen und die mittleren Abweichungen der chemischen Verschiebungen aufgelistet. Bei zwei Resonanzen ($\delta^{HN} = 8,25$ ppm und 8,19 ppm) ergaben sich jeweils die Aminosäuren Leucin und Lysin als mögliche Zuordnung bei einer kleinen mittleren Abweichung. Weiteren markanten Resonanzen konnten Alanin, Glycin und Serin zugeordnet werden, welche wie Leucin und Lysin von Amidprotonen des Proteinrückgrats stammten. Die beiden Resonanzen bei $\delta^{HN} = 7,53$ ppm und 6,82 ppm wurden den H^{ϵ} -Seitenketten-Protonen des Glutamins zugeordnet. Die H^{δ} -Seitenketten-Protonen des Asparagins würden ebenfalls in diesem Bereich Resonanzen zeigen, aber die mittlere prozentuale Abweichung der chemischen

Verschiebungen war bei den Glutamin-Resonanzen geringer. Die Resonanzen des Glycins waren auf Grund der ^{15}N chemischen Verschiebung des Proteinrückgrats eindeutig zuzuordnen, da sich diese mit im Mittel 109,22 ppm deutlich von den durchschnittlichen 120,89 ppm der restlichen Aminosäuren unterschieden [Koehler 2014]. Die Resonanz der Amidprotonen bei 5,73 ppm konnte keiner Aminosäure zugeordnet werden.

Tabelle 4.22 Zuordnung der markanten Resonanzen im HSQC-Spektrum durch Vergleich der chemischen Verschiebungen mit denen von Modelpeptiden. Angegeben sind die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen (δ^{HN}) und der ^{15}N -Isotopen (δ^{N}) sowie die aus Vergleichen mit Modellpeptiden [Koehler et al. 2012; Koehler 2014; Wishart et al. 1995] und der „Biological Magnetic Resonance Data Bank“ (BMRB) [Ulrich et al. 2008] ermittelten Aminosäuren und die mittlere prozentuale Abweichung der chemischen Verschiebungen von der im HSQC-Spektrum sichtbaren Resonanzen.

δ^{HN} [ppm]	δ^{N} [ppm]	Aminosäure	$\Delta\delta^{\text{HN}}$ [%]	$\Delta\delta^{\text{N}}$ [%]
8,38	123,67	Ala	1,6	0,5
8,31	108,87	Gly	0,8	0,3
8,25	122,33	Leu	0,8	0,3
		Lys	0,8	1,0
8,19	122,13	Leu	0,6	0,2
		Lys	0,8	0,9
8,14	117,58	Ser	2,2	1,2
7,53	111,84	Gln	1,5	0,4
6,82	111,84	Gln	1,5	0,4

Nach Kauppinen et al. [Kauppinen et al. 1992; Kauppinen et al. 1992; Kauppinen et al. 1993] und Kauppinen & Palvimo [Kauppinen & Palvimo 1992] konnten verschiedene Proteine als mögliche Quelle für die NMR-sichtbaren Proteinresonanzen in Säureextrakten aus dem zerebralen Cortex von Meerschweinchen und Ratten ermittelt werden. Dazu zählten Thymosin β 4, Thymosin β 10, Prothymosin α , Histon H1, Ubiquitin und HMG 17. Nach Kauppinen et al. [Kauppinen et al. 1993] bildeten Thymosin β 4 und Histon H1 mit insgesamt 46 % aller extrahierten Proteine die Mehrheit im zerebralen Cortex. Der Vergleich der Sequenzen aller zuvor erwähnten Proteine zeigte eine hohe Übereinstimmung der Histon H1 Isoformen (H1.1 – H1.5) mit den am stärksten ausgeprägten Resonanzen aus [Tabelle 4.22](#). Im Schnitt bestanden die Sequenzen der Histon H1 Isoformen zu 70,5 % aus den Aminosäuren Alanin (23,2 %), Glutamin (0,6 %), Glycin (6,9 %), Leucin (4,4 %), Lysin (27,8 %) und Serin (7,6 %). In den Proteinen Thymosin β 4, Thymosin β 10, Prothymosin α und Ubiquitin bildeten diese Aminosäuren nur 31,5 - 47,7 % der Sequenzen. Im Protein HMG 17 wurde die Sequenz zu 59,9 % aus den genannten Aminosäuren gebildet ([Tabelle 4.23](#)). Ausgehend von diesen Proteinen würde somit das Protein Histon H1 auf Grund der Häufigkeit der Aminosäuren in dessen Sequenz, welche in dem HSQC-Spektrum der markierten HTZ-349 am stärksten ausgeprägt waren, mit der größten Wahrscheinlichkeit für die NMR-sichtbaren Resonanzen verantwortlich sein. Allerdings kann dieser Vergleich mit den Anteilen in der Aminosäuresequenz der Proteine nur als erster Anhaltspunkt dienen. Kauppinen et al. [Kauppinen et al. 1992] konnten zwar auch nachweisen, dass die 1D ^1H -NMR-Spektren von Histon H1 und Thymosin β 4 die typischen makromolekularen Resonanzen M1 - M7 zeigten. Allerdings ist bei Histon H1 auf Grund der Größe des Proteins und der Lokalisation im Zellkern

die Wahrscheinlichkeit als Ursache der mobilen Proteinresonanzen in Frage zu kommen eher gering.

Tabelle 4.23 Vergleich der Anteile der zugeordneten Aminosäuren in den Aminosäuresequenzen verschiedener Proteine.

Verglichen wurden die Aminosäuresequenzen, der in der Literatur gefundenen vermuteten Proteine Histon H1, bzw. dessen Isoformen H1.1 - H1.5, Thymosin β 4, Thymosin β 10, Prothymosin α , HMG 17 und Ubiquitin, welche für die makromolekularen Resonanzen im ^1H -NMR-Spektrum verantwortlich sein sollen. Die Länge der Aminosäuresequenz ist in der Anzahl an Aminosäuren (AS) angegeben, die Anteile der jeweiligen Aminosäuren in der Sequenz und der gesamte Anteil aller zugeordneten Proteine in der Sequenz wurden in Prozent angegeben. Die größte Übereinstimmung der in dieser Arbeit zugeordneten Proteine mit dem Vorkommen in der Aminosäuresequenz der verglichenen Proteine war demnach bei den Isoformen von Histon H1 zu erkennen (68,3 - 73,5 %). Die Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe der Proteindatenbank „UniProt“ [The UniProt Consortium, 2017] bestimmt und analysiert.

Protein	Länge [AS]	Masse [Da]	Ala [%]	Gln [%]	Gly [%]	Leu [%]	Lys [%]	Ser [%]	Gesamt [%]
Histon H1.1	215	21842	19,5	0,9	6,0	4,7	26,5	10,7	68,3
Histon H1.2	213	21365	22,5	0,5	7,5	4,2	27,7	7,0	69,4
Histon H1.3	221	22350	20,8	0,9	7,7	4,5	27,6	7,2	68,7
Histon H1.4	219	21865	26,9	0,5	6,4	4,1	28,3	7,3	73,5
Histon H1.5	226	22580	26,5	0,4	7,1	4,4	28,8	5,8	73,0
Thymosin β 4	44	5053	4,5	6,8	2,3	4,5	20,5	9,1	47,7
Thymosin β 10	44	5026	6,8	4,5	2,3	4,5	18,2	6,8	43,1
Prothymosin α	111	12203	9,9	1,8	8,1	0,9	7,2	3,6	31,5
HMG 17	90	9393	17,8	3,3	11,1	1,1	24,4	2,2	59,9
Ubiquitin	76	8565	2,6	7,9	7,9	11,8	9,2	3,9	43,3

5 Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse aus dem vorherigen Kapitel noch einmal genauer beleuchtet und interpretiert. Es wird dabei sowohl auf das Perfusions-System an sich als auch auf die Ergebnisse der metabolischen Analyse der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 und der humanen neuronalen Stammzelllinie ReNCX eingegangen. Des Weiteren wird auf die Charakterisierung der NMR-sichtbaren mobilen Proteinresonanzen der Zelllinie HTZ-349 über eine ^{15}N -Markierung eingegangen.

5.1 Vergleich des etablierten Perfusions-Systems mit vergleichbaren Systemen und Optimierungsmöglichkeiten

Einer der häufigsten Unterschiede des in dieser Arbeit konstruierten Perfusions-System im Vergleich zu Systemen anderer Gruppen ist, dass bei dem hier etablierten System die Zuleitung des Mediums in der Perfusionskammer von oben stattfindet, während bei anderen Gruppen die Zuleitung hauptsächlich von unten erfolgt [Foxall et al. 1984; Lyon et al. 1986; Ng et al. 1992; Mancuso et al. 2004; Gross et al. 2007]. Der Vorteil einer Zuleitung von oben liegt in der Ersparnis einer Blasenfalle und einer damit verbundenen Reduzierung des Gesamtvolumens. Außerdem kann der Agarosefaden durch den Fluss des Mediums nicht aus den Messbereich gespült werden, was vor allem beim Start der Perfusion eine Rolle spielt, also beim Übergang vom ruhenden System zu einem kontinuierlichen Fluss. Nachteilig bei einer Zuleitung von oben ist dagegen, dass der Agarosefaden unter Umständen aus der Perfusionskammer durch die Ableitung gedrückt werden kann. Dieses Risiko wurde durch einen kleineren Durchmesser der Ableitung und einer niedrigen Perfusionsrate minimiert. In anderen Perfusionskammern wurden zusätzlich gitterartige Strukturen eingebaut um den Agarosefaden im Messbereich zu fixieren [Ng et al. 1992; Chen et al. 1994; Mancuso et al. 2004]. Allerdings wurde in diesen Fällen auch Perfusionskammern mit größeren Innendurchmessern (10 - 20 mm) verwendet. Bei der hier verwendeten Perfusionskammer mit einem Innendurchmesser von ca. 4 mm und einem Durchmesser des Ableitungsschlauchs von etwa 3 mm war zusammen mit dem Agarosefaden zu wenig Platz für eine derartige Fixierung des Gelfadens.

Einige Gruppen verwendeten für die Zu- und Ableitung thermische Isolierungen um den Sauerstoffgehalt im Medium bei 37 °C zu bestimmen [Mancuso et al. 2004; Gross et al. 2007]. Der Grund dafür ist die starke Temperaturabhängigkeit der Gaslöslichkeit. Allerdings ist zu erwähnen, dass in diesen Fällen NMR-Spektrometer mit deutlich geringeren magnetischen Feldstärken verwendet wurden. Daher konnten die Zu- und Ableitungen relativ kurzgehalten werden, da die notwendigen technischen Geräte wie die Pumpe oder der Inkubator näher am Spektrometer platziert werden konnten. In dem für diese Arbeit konstruierten Perfusions-System wurde wegen einer Gesamtlänge des Leitungs-Systems von 27,6 m auf eine thermische Isolierung verzichtet. Dies war möglich, da die Gaslöslichkeit mit abnehmender Temperatur zunimmt. Durch die gasdichte Bauweise mit Edelstahl-Kapillarrohren wurde somit gewährleistet, dass bei der Abkühlung auf Raumtemperatur zwischen Inkubator und Spektrometer keine Verfälschung der Gaszusammensetzung des Mediums auftrat. Zur Bestimmung des Sauerstoffgehaltes bei 37 °C musste allerdings der gemessene Sauerstoffgehalt bei Raumtemperatur, wie in [Kapitel 3.7.2](#) beschrieben, umgerechnet werden.

Viele Perfusions-Systeme wurden als geschlossene Kreisläufe konstruiert [Gonzalez-Mendez et al. 1982; Foxall et al. 1984; Ng et al. 1992; Mancuso et al. 2004]. Ein Vorteil eines solchen Systems ist vor allem, dass insgesamt nur eine geringe Menge an Perfusionsmedium benötigt wird. Meist wurde diese Bauart zudem mit hohen Perfusionsraten von bis zu 16 ml/min verwendet. Der Nachteil ist der kontinuierliche Verbrauch an Nährstoffen und die Ansammlung an metabolischen Abfallprodukten. In dem hier konstruierten System wurde eine Bauweise mit konstantem Durchfluss an frischem Medium bevorzugt, da auf Grund einer geringeren Zellzahl und einem wesentlich kleineren Volumen der Perfusionskammer die Perfusionsrate mit 100 µl/min sehr niedrig gehalten werden konnte. Daher war der Gesamtverbrauch an Medium bei einer 72-stündigen Messung inklusive der Menge, die für Vorbereitungen benötigt wurde, mit ca. 500 ml relativ gering. Zudem ermöglicht eine derartige Bauweise die Injektion mit einem Additiv für eine zeitlich begrenzte Phase sowie eine zeitaufgelöste Fraktionssammlung des verbrauchten Mediums. Letzteres würde unabhängig von intrazellulären Überlagerungen die Möglichkeit bieten die metabolischen Veränderungen im Laufe der Zeit und nach Veränderung der Umgebungsbedingungen zu untersuchen.

Zur Immobilisierung der Zellen wurde häufig die Methode der Einbettung in ein Agarosegel verwendet [Jacobson & Cohen 1981; Foxall et al. 1984; Lyon et al. 1986; Daly et al. 1987; Lundberg et al. 1994]. Der Vorteil dieser Methode ist die einfache und kostengünstige Durchführbarkeit, welche unabhängig von der Zellkultur benutzt werden kann. Nachteilig ist jedoch die geringe Lagestabilität des Agarosefadens. Selbst bei einer Fixierung im Messbereich durch permeable Begrenzungen kann der Agarosefaden je nach Geldichte auf Grund der Schwerkraft und der Perfusionsrate zusammensacken. Eine höhere Geldichte würde die Stabilität erhöhen, aber gleichzeitig die Diffusion der Metaboliten behindern, wodurch die Umgebungsbedingungen, wie zum Beispiel der pH-Wert und damit verbunden die Zellvitalität deutlich beeinflusst würden. Alternativen sind Kügelchen aus Polystyrol, welche zusätzlich mit Kollagen, oder Fibronektin beschichtet werden können um die Anhaftung der Zellen zu begünstigen [Mancuso et al. 2004]. Die Zellen können bei dieser Methode direkt auf der Oberfläche der Mikroträger kultiviert werden und dann in die Perfusionskammer überführt

werden. Bei entsprechend dichter Packung ist eine Lagestabilität unter Perfusion gewährleistet. Eine Schwierigkeit könnte dabei das Erreichen der erforderlichen Zelldichte im Messbereich sein, aber bei einer ausreichend großen Oberfläche könnte jede beliebige Struktur verwendet werden, auf der die Zellen kultiviert werden können. Dies könnte eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse liefern und auch zu einer Verbesserung der Messbedingungen führen, da sich bei adhärent wachsenden Zellen apoptotische und nekrotische Zellen ablösen würden und somit keine metabolischen Überlagerungen von lebenden und toten Zellen ergäben, wie es bei der Einbettung in ein Gel der Fall ist.

Die Konstruktion einer Injektionseinheit ermöglicht die Zugabe eines Additivs in die Perfusionskammer in einem zeitlich begrenzten Rahmen. In dieser Arbeit konnte ein funktionierender Prototyp geschaffen werden, der über die Peristaltik-Pumpe des Perfusions-Systems betrieben werden kann. Allerdings reichte dessen Volumen nicht aus um die volle Konzentration des Additivs in der Perfusionskammer zu gewährleisten. Für einen zukünftigen Einsatz müsste daher das Gesamtvolumen des Injektors erhöht werden. Zudem müssten gut zu sterilisierende Materialien wie Glas und Edelstahl zur Konstruktion der endgültigen Injektionseinheit verwendet werden, um eine Wiederverwendbarkeit zu gewährleisten.

Das in dieser Arbeit etablierte Perfusions-System ermöglichte die metabolische Analyse unterschiedlicher Zelltypen bei einer kontinuierlichen Perfusion und unter kontrollierten Bedingungen. Im Gegensatz zu früher entwickelten Perfusions-Systemen ist dieses System äußerst gasdicht, so dass selbst hypoxische Bedingungen in der Perfusionskammer erreicht werden können. Die stetige Messung des Sauerstoffgehalts in der Zu- und Ableitung ermöglicht eine Kontrolle der Sauerstoffverbrauchsrate der Zellen. Eine zusätzlich konstruierte Injektionseinheit gestattet eine zeitlich begrenzte Zugabe eines Additivs und die Möglichkeit zur manuellen oder automatischen Fraktionssammlung gewährt eine zeitlich aufgelöste metabolische Analyse.

5.2 Interpretation und Vergleich der metabolischen Analyse der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349

Die humanen Glioblastom-Zellen der Zelllinie HTZ-349 wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Als Ausgangspunkt für Vergleiche mit den Perfusionsmessungen wurden Tumorzellen für 72 Stunden ohne Perfusion metabolisch analysiert. Im Perfusions-System wurden die Glioblastom-Zellen dann jeweils unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen sowie unter pH-Stress beobachtet und metabolisch ausgewertet. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der einzelnen Messungen analysiert und ein Vergleich der Auswirkungen der unterschiedlichen Bedingungen gezogen.

5.2.1 HTZ-349 ohne Perfusion

Als Ausgangspunkt für Vergleiche mit den metabolischen Analysen der Zellen in dem konstruierten Perfusions-System wurden zunächst Zellen ohne Perfusion untersucht. Ohne entsprechende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie durch die Ansammlung an metabolischen Produkten wie Laktat und der damit verbundenen Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich (6,5 pH) waren die Glioblastom-Zellen schnell mehreren Stressbedingungen ausgesetzt. Dies resultierte in einem starken Rückgang der Zellvitalität durch Apoptose und Nekrose, so dass nach 72 Stunden nur noch ein Anteil an lebenden Zellen von 6 % ermittelt werden konnte. Dies zeigt, dass eine metabolische Betrachtung von lebenden Zellen ohne Perfusion über einen längeren Zeitraum nicht sinnvoll ist und die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Versorgung der Zellen.

Bereits im zweiten Messintervall, nach 6 Stunden, war der maximale Glukose-Verbrauch in der Perfusionskammer erreicht ([Abbildung 4.13](#), Seite 78). Die Laktat-Synthese spiegelte den Glukose-Verlauf wider und zeigte dementsprechend ihr Maximum ebenfalls zu diesem Zeitpunkt. Die gemessenen Konzentrationen im NMR-Röhrchen zeigten einen starken, aber nicht vollständigen Verbrauch der Glukose ($C_P^E = 0,209 \text{ mM}$), ähnliches galt für den Metaboliten Pyruvat ($C_P^E = 0,288 \text{ mM}$). Zudem zeigte der Laktat-Verlauf einen leichten Rückgang der Konzentration im Messbereich. Dies alles lässt auf Diffusionsprozesse innerhalb des NMR-Röhrchens schließen. Die Zellen, welche in einem Agarosefaden immobilisiert waren, befanden sich im unteren Drittel des Röhrchens, das mit insgesamt ca. 2 ml Medium gefüllt war. Auf Grund der fehlenden Perfusion konnten sich Metaboliten innerhalb des Röhrchens deswegen nur durch Diffusion bewegen. Durch Konzentrationsunterschiede getrieben diffundierten daher Metaboliten wie Glukose und Pyruvat aus dem oberen Bereich des Röhrchens zu den Zellen, während Zellprodukte wie Laktat sich entgegengesetzt verhielten und von den Zellen weg diffundierten. Dies erklärt auch den zu geringen ermittelten Verbrauch beziehungsweise die reduzierte Synthese der Metaboliten im Überstand des NMR-Röhrchens, welcher aus dessen oberen Bereich entnommen wurde.

Ein weiterer wichtiger Metabolit, die Aminosäure Glutamin, zeigte von Beginn an eine starke Konzentrationsabnahme, welche ebenfalls in der Gesamtbilanz durch Diffusionsprozesse beeinflusst wurde. Dessen Verbrauch wurde durch die Erhöhung der Konzentrationen von Glutamat und Pyro-Glutamat begleitet. Glutamat kann durch die Glutaminase aus Glutamin unter Abspaltung von Ammoniak gebildet werden und ist der erste Schritt der Glutaminolyse. Pyro-Glutamat kann nicht-enzymatisch aus Glutamin oder enzymatisch aus Glutathion durch die γ -Glutamylcyclotransferase entstehen [Kumar & Bachhawat 2012]. In eigenen Experimenten ohne Zellen konnte jedoch eine kontinuierliche Umwandlung von Glutamin zu Pyro-Glutamat in derselben Größenordnung im Medium nachgewiesen werden, wodurch ein Beitrag der Zellen ausgeschlossen werden konnte. Die geringere Zunahme der Pyroglutamat-Konzentration im Überstand (0,404 mM) im Vergleich zur Perfusionskammer (0,591 mM) würde zunächst doch auf eine Beteiligung der Zellen schließen lassen. Die nicht-enzymatische Umwandlung von Glutamin zu Pyro-Glutamat ist jedoch auch abhängig von Temperatur [Tritsch & Moore 1962] und pH-Wert [Gilbert et al. 1949]. Beide Parameter könnten im oberen Bereich des NMR-Röhrchens, aus welchem der Überstand stammte, im Vergleich zum unteren

Bereich etwas verändert sein. Unterschiede im pH-Wert könnten auf Grund von diffusionsbedingten Abweichungen in der Laktat-Konzentration aufgetreten sein und wegen der Positionierung der Heizspulen unterhalb des NMR-Röhrchens wären Temperaturunterschiede damit ebenfalls möglich gewesen. Zusammen mit den Ergebnissen eigener Experimente ist deswegen davon auszugehen, dass das detektierte Pyro-Glutamat durch spontane Umwandlung aus dem Glutamin des Mediums entstanden ist.

Die gemessene Cholin-Konzentration in der Perfusionskammer zeigte eine kontinuierliche Zunahme im Laufe der Messung ([Abbildung 4.13](#), Seite 78). Erhöhte Cholin-Konzentrationen sind typisch für Tumorzellen. Dort dient es als Ausgangsstoff und Abbauprodukt von Phosphatidylcholin und trägt somit zur Verwaltung der Lipiddoppelschicht-Zellmembranen bei [Glunde et al. 2011]. Hier ist auf Grund der geringen Zellvitalität am Ende der Messung davon auszugehen, dass die kontinuierliche Zunahme der Cholin-Konzentration auf den Abbau der Zellmembranen zurückzuführen ist.

Die restlichen analysierten Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin und Valin zeigten alle ein ähnliches Verhalten im zeitlichen Verlauf. Alle vier wiesen einen zu Beginn erhöhten Verbrauch auf, welcher mit der Zeit abnahm. Diese Aminosäuren können intrazellulär als Kohlenstoffquellen oder zur Proteinsynthese dienen. Die Abnahme ihres Verbrauchs lässt sich durch die starke Verminderung der Zellvitalität und des damit verbundenen verringerten Bedarfs erklären.

Im zweiten Teil der metabolischen Untersuchung der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 ohne Perfusion wurden die makromolekularen Resonanzen untersucht. Die Analyse der mobilen Proteinresonanzen war schwierig, da alle Proteinresonanzen außer M7 (bei 2,99 ppm) von den deutlich stärker ausgeprägten Resonanzen der mobilen Lipide überlagert waren. Der zeitliche Verlauf der Proteinresonanz M7 ergab keine nennenswerte Änderung der Proteinkonzentration über die gesamte Messung ([Abbildung 4.14](#), Seite 81). Dies deutet daraufhin, dass keine Proteinsynthese während der Messung stattgefunden hat. Unterstützt wurde diese Vermutung durch die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren im Medium, welche normalerweise in Form von fötalem Kälberserum zugegeben wird, um die Proliferationsfähigkeit der Zellen zu gewährleisten. Außerdem waren die Bedingungen für die Zellen auf Grund der fehlenden Perfusion äußerst ungünstig, so dass vermutlich selbst mit Wachstumsfaktoren die Proliferationsrate sehr schnell gegen Null tendiert hätte. Der konstante Verlauf der Proteinresonanz schließt allerdings auch einen Proteinabbau aus. Eine mögliche Erklärung dafür wäre ein nekrotisches statt apoptotisches Verhalten der Zellen, da die Apoptose normalerweise mit einem Proteinabbau einhergeht [Solary et al. 1998].

Die Analyse der NMR-sichtbaren mobilen Lipide zeigte für alle Lipidresonanzen in den ersten 12 Stunden einen Anstieg. Den stärksten Anstieg zeigten die Methylengruppe (ML2) und die Methingruppe (ML6). Nach Erreichen des Maximums sanken die Lipidkonzentrationen wieder kontinuierlich bis zum Ende der Messung auf das Niveau der Ausgangswerte. Ein Anstieg der NMR-sichtbaren mobilen Lipide wird, wie in [Kapitel 2.4.3.1](#) beschrieben, mit Stressbedingungen und Wachstumsstopp, wie auch Apoptose und Nekrose in Verbindung gebracht; Bedingungen die in dieser Messung erfüllt waren. Zusätzlich ist der starke Anstieg

der Methingruppe ein Anzeichen für einen Wachstumsstopp, da die ungesättigten Fettsäuren, welche in den Zellmembranen die Fluidität erhöhen, hier in erhöhtem Maß in den Zellen in NMR-sichtbaren Lipidtropfen gespeichert wurden. Die Abnahme der mobilen Lipide könnte durch einen intrazellulären Abbau der Lipide über die β -Oxidation verursacht worden sein. Der Grund dafür könnte die schlechte Nährstoffversorgung in diesem Fall ohne Perfusion gewesen sein, wodurch die Zellen gezwungen wurden die Lipide als hauptsächliche Energiequelle zu nutzen. Unterstützt würde diese Vermutung durch den Verlauf der Metaboliten Glukose, Pyruvat und Laktat, welche in Tumorzellen den wichtigsten Anteil am Energiemetabolismus haben. Diese drei Metaboliten zeigen ebenfalls nur die ersten 12 Stunden eine Veränderung, danach waren Glukose und Pyruvat im Messbereich fast vollständig verbraucht.

5.2.2 HTZ-349 unter Perfusion bei normoxischen Bedingungen

Die metabolische Untersuchung der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 unter Perfusion zeigte eine deutliche Verbesserung der Zellvitalität gegenüber der Situation ohne Perfusion. Durch eine kontinuierliche Zufuhr eines Mediums mit 100 μ l/min, welches in einem modifizierten Inkubator begast wurde, konnte zusätzlich zur Nährstoffversorgung sowohl die Sauerstoffversorgung als auch ein physiologischer pH-Wert im Medium aufrechterhalten werden.

Zur Berücksichtigung der Perfusionsrate wurden die in der Perfusionskammer ermittelten Konzentrationsänderungen im Vergleich zum Medium mit der Flussrate multipliziert. Dadurch ergab sich dementsprechend die Stoffmengendifferenz pro Zeit der jeweiligen Metaboliten. Glukose und Laktat demonstrierten vor allem in den ersten 6 - 12 Stunden eine Zunahme des Verbrauchs, beziehungsweise der Synthese. Die genauere Analyse des Verlaufs der Metaboliten Glukose, Pyruvat und Laktat zeigte vor allem in den ersten 6 Stunden der Messung, dass mehr Glukose und Pyruvat für zelluläre Prozesse außer der Laktat-Synthese verwendet wurden ([Abbildung 4.30 A](#), Seite 124). Nach dieser Zeit wurden die beiden Metaboliten dann hauptsächlich zu Laktat umgesetzt. Insgesamt wurden je nach anteiliger Verwendung des Pyruvats aus dem Medium für die Laktat-Synthese zwischen 60 - 78 % der Glukose zu Laktat verstoffwechselt. Dies zeigt, dass die Glioblastom-Zellen, wie erwartet, insgesamt hauptsächlich anaerobe Glykolyse betrieben, aber vor allem zu Beginn der Messung wurde Glukose auch noch für andere intrazelluläre Prozesse verwendet. Möglich wären zum Beispiel die Nukleotid-Synthese, oder über Pyruvat, anstatt der anaeroben Glykolyse, die Belieferung des Citratzyklus. Insgesamt also Prozesse, die mehr auf einen proliferativen Status der Zellen hinweisen. Ohne fötalem Kälberserum im Perfusionsmedium wären die Zellen prinzipiell zwar nicht in der Lage zu proliferieren, allerdings wurden die Zellen bis unmittelbar vor der Messung noch in Medium mit Serum kultiviert. Es könnte also sein, dass sich die Zellen deswegen zu Beginn der Messung noch vorübergehend in einem ausklingenden proliferativen Status befanden.

Der zunehmende Glutamin-Verbrauch spiegelte hier klar die Pyro-Glutamat-Synthese wider. Im Auffangbehälter konnte eine um 0,190 mM erniedrigte Glutamin-Konzentration im Vergleich zu Pyro-Glutamat nachgewiesen werden. Der zeitliche Verlauf dieser beiden Metaboliten zeigte bei der Gegenüberstellung vor allem in der ersten Hälfte der Messung ein Übergewicht auf der Seite des Glutamins ([Abbildung 4.31 A](#), Seite 125). Dies deckt sich mit der Analyse des Glukose-Metabolismus und deutet darauf hin, dass Glutamin von den Zellen hauptsächlich in der ersten Hälfte der Messung verstoffwechselt wurde. Auch die erhöhte Stoffmenge pro Zeit des Glutamats zu Beginn der Messung ([Abbildung 4.16](#), Seite 85), welche im zeitlichen Verlauf abnahm, deckt sich mit dem Verhalten des Glutamins, da Glutamat intrazellulär aus Glutamin synthetisiert werden kann. Die erhöhten Stoffmengen pro Zeit im Vergleich zum Medium und der geringfügige Verbrauch des Glutamats im Auffangbehälter verdeutlichen zudem, dass die in der Perfusionskammer detektierten Stoffmengen zum größten Teil auf den intrazellulären Anteil des Glutamats zurückzuführen waren und zudem im Medium enthaltenes Glutamat verbraucht wurde.

Wie erwartet waren auch bei der Perfusionsmessung im Vergleich zum Medium die Cholin-Werte erhöht, allerdings war dieser Überschuss nur minimal und im Auffangbehälter konnte außerdem ein geringfügiger Verbrauch festgestellt werden. Cholin dient intrazellulär als Ausgangsstoff für Phosphatidylcholin, welches ein Bestandteil der Zellmembran ist. Die erhöhten Werte in der Perfusionskammer könnten daher von intrazellulären Anteilen des Cholins verursacht worden sein. Die ermittelte Abnahme der Cholin-Stoffmenge im Verlauf der Messung würde damit ebenfalls zu einem proliferativen Status zu Beginn der Messung passen.

Die restlichen betrachteten Aminosäuren zeigten alle bis auf Valin ein ähnliches Verhalten. Isoleucin, Phenylalanin und Tyrosin wiesen in der Perfusionskammer im Vergleich zum Medium erniedrigte Stoffmengen pro Zeit auf ([Abbildung 4.16](#), Seite 85). Diese Abnahme konnte auch im Auffangbehälter für Isoleucin und Tyrosin bestätigt werden. Phenylalanin demonstrierte dagegen eine Konzentrationszunahme im Auffangbehälter, welche durch Überlagerungen mit einem Multiplett einer unbekannten Resonanz verursacht wurden. Die minimale Zunahme des Verbrauchs mit der Zeit bei Phenylalanin und Tyrosin könnte durch eine Abnahme intrazellulärer Anteile verursacht worden sein. Valin zeigte im Gegensatz dazu eine minimale Zunahme der Stoffmenge pro Zeit in der Perfusionskammer und eine Konzentrationszunahme von 14 μM im Auffangbehälter. Möglicherweise stammte diese Zunahme von einem Proteinabbau. Die Zunahme der Stoffmenge im Laufe der Zeit würde für eine Proteolyse sprechen, welche auch eine biochemische Eigenschaft der Apoptose ist [Solary et al. 1998], denn auch der Sauerstoffverbrauch nahm kontinuierlich ab. Dies unterstützt die Vermutung, dass im zeitlichen Verlauf die Zellvitalität stetig abnahm, denn in [Kapitel 4.6](#) konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation der Zellvitalität mit dem Sauerstoffverbrauch bei einer nahezu konstanten Sauerstoffverbrauchsrates, wie es hier der Fall war, möglich ist. Auf Grund der erhöhten Konzentration des Valins im Auffangbehälter liegt die Vermutung nahe, dass die abgebauten Proteine hohe Valin-Anteile enthielten. In den Experimenten mit den ^{15}N -markierten NMR-sichtbaren mobilen Proteinen konnte dies nicht bestätigt werden. Allerdings ist der Anteil an NMR-sichtbaren Proteinen mit nur etwa 2,5 % auch sehr gering [Ramm 2011], dementsprechend ist es durchaus möglich, dass die Zunahme des Valins auf dem Abbau von Proteinen beruht, die nicht NMR-sichtbar waren.

Die Analyse der NMR-sichtbaren mobilen Proteine konnte auch bei diesem Experiment auf Grund der Überlagerungen mit den mobilen Lipidresonanzen nur für M7 (2,99 ppm) durchgeführt werden. Es konnte eine kontinuierliche und lineare Abnahme der Konzentration um insgesamt 44 % festgestellt werden (Abbildung 4.17, Seite 88). Die Zellvitalität nahm über die gesamte Messung um nahezu denselben Betrag ab (45 %). Auch der Sauerstoffverbrauch korreliert sowohl mit dem Anteil an vitalen Zellen als auch mit der Abnahme der Intensität der Proteinresonanz (Abbildung 5.1). Dementsprechend könnte für die Abnahme der NMR-sichtbaren Proteine ein Proteinabbau durch apoptotische Zellen verantwortlich gewesen sein.

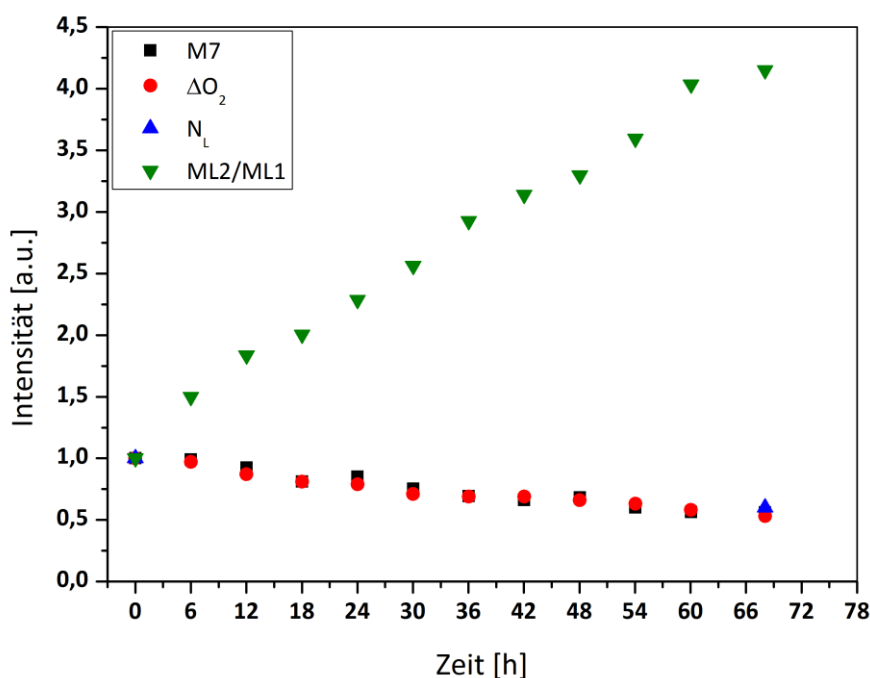


Abbildung 5.1 Vergleich der zeitlichen Entwicklung der mobilen Proteine, des Sauerstoffverbrauchs, der Anzahl an lebenden Zellen und des Lipid-Verhältnisses ML2/ML1 für die Perfusionsmessung mit der Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 unter normoxischen Bedingungen. Dargestellt sind die auf den ersten Wert normierten Verläufe der mobilen Proteine am Beispiel der Resonanz M7 (schwarz), des Sauerstoffverbrauchs ΔO_2 (rot), des Anteils an lebenden Zellen N_L (blau) und des Lipid-Verhältnisses ML2/ML1 (grün), welches mit der Anzahl an apoptotischen Zellen korreliert. Grundlage für die Abbildung waren die ermittelten Anteile an vitalen Zellen zu Beginn und am Ende der Messung, die Sauerstoffmessung an beiden Sensoren sowie diffusionsgewichtete 1H -NMR-Spektren im Fall der mobilen Proteine und Lipide bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 μ l/min. ML1 ist die Resonanz von Methylgruppen, ML2 ist die Resonanz von Methylengruppen, M7 ist die einzige nicht von mobilen Lipiden überlagerte Proteinresonanz bei 2,99 ppm. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: b-Wert = $7,4 \cdot 10^9$ s/m², Δ = 100 ms, δ = 2 ms, α = 0,2 und Gradientenstärke = 0,51 T/m. Der Gradient wurde so gewählt, dass die niedermolekularen Anteile abgeschwächt wurden.

Bei den mobilen Lipidresonanzen war ein deutlicher Anstieg der Methylen- (ML2) und Methingruppe (ML6) zu beobachten. Dies spricht, nach der Theorie der NMR-sichtbaren mobilen Lipidresonanzen (Kapitel 2.4.3.1), für einen zunehmenden Anteil an apoptotischen Zellen. Die Zunahme des Lipidverhältnisses ML2/ML1 auf das etwa 4-fache nach 70 Stunden ist dabei nahezu linear. Dies würde für eine lineare Zunahme des Anteils an apoptotischen Zellen sprechen und passt zu der linearen Abnahme des Sauerstoffverbrauchs, der Intensität der Proteinresonanz und der Zellvitalität (Abbildung 5.1). Interessant ist in diesem

Zusammenhang, dass nach ca. 24 Stunden der Glukose-Verbrauch und die Laktat-Synthese praktisch konstant blieben. Mit der Annahme, dass der Anteil an lebenden Zellen stetig abnahm, würde dies bedeuten, dass der Anteil an lebenden Zellen verstärkt anaerobe Glykolyse betrieben haben. Die restlichen Lipidresonanzen zeigten ein unterschiedliches Verhalten. ML3 – eine Resonanz von gesättigten Fettsäuren – zeigte ebenfalls einen minimalen Anstieg, während die Resonanz der Methylgruppe (ML1) und ML5 – ebenfalls eine Resonanz von gesättigten Fettsäuren – praktisch über die gesamte Messung unverändert blieben. Die Resonanz der Methingruppe (ML6) nahm im Laufe der Messung um etwa das 5-fache zu, wohingegen eine weitere Resonanz ungesättigter Fettsäuren (ML4) sogar einen leichten Rückgang um 20 % verzeichnete. Dieser Abfall könnte aber auch von der überlagernden Glutamin-Resonanz stammen, denn dieser Metabolit war in hoher Konzentration im Medium enthalten, so dass dessen Resonanz bei der verwendeten Diffusionswichtung noch nicht stark genug abgeschwächt war. Insgesamt betrachtet veränderte sich also die Zusammensetzung der NMR-sichtbaren mobilen Lipide über die Messung zu einem verstärkten Anteil an Methylen- und Methingruppen.

5.2.3 HTZ-349 unter Perfusion bei hypoxischen Bedingungen

Zur Untersuchung der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 unter hypoxischen Bedingungen musste die Messung zunächst unter normoxischen Bedingungen starten. Der Grund dafür lag in der Vorbereitung des Perfusions-Systems, denn die Zellen konnten nur unter normoxischen Bedingungen in der Perfusionskammer immobilisiert werden. Da zusätzliche Experimente zeigten, dass hypoxische Phasen unter 10 Stunden keine detektierbaren metabolischen Veränderungen verursachten, wurde hier eine 22-stündige hypoxische Phase verwendet. Zudem wurde am Ende der Messung wieder eine normoxische Phase angeschlossen, um metabolische Veränderungen einer Rückkehr der optimalen Sauerstoffbedingungen und den Sauerstoffverbrauch der Zellen untersuchen zu können. Während die Einstellung der Sauerstoffkonzentration im Medium fehlerfrei funktionierte – in der Zuleitung zur Perfusionskammer konnte während der hypoxischen Phase ein mittlerer Sauerstoffgehalt von $0,5 \pm 1,0$ % O_2 erreicht werden – war die Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Werts hier schwer zu etablieren. Ein Grund dafür war die überraschend erhöhte Glykolyse-Rate der Zellen im Vergleich zu sonstigen Messungen mit dieser Zelllinie. Durch die daraus resultierende starke Laktat-Synthese wurde der pH-Wert in den sauren Bereich verschoben, so dass die übliche CO_2 -Begasung von 8,7 % mehrmals auf letztlich 6,5 % nachreguliert werden musste, um den pH-Wert in der Perfusionskammer in den physiologischen Bereich zu lenken. Zudem wurde die CO_2 -Begasung während der Veränderung des Sauerstoffgehaltes beeinflusst, da der Inkubator auf Grund der starken Flutung des Innenraums mit Stickstoff mit der Regelung des CO_2 -Gehaltes an seine Grenzen kam. Letztlich konnte durch die manuelle Regelung trotzdem ein mittlerer pH-Wert von $7,29 \pm 0,10$ pH erreicht werden.

Neben der hohen Glykolyse-Rate war hier auch der Sauerstoffverbrauch der Glioblastom-Zellen stark erhöht ([Abbildung 4.18](#), Seite 90). Bei der Perfusionsmessung unter normoxischen Bedingungen lag der Sauerstoffverbrauch zu Beginn bei 6,2 % O₂, während er bei dieser Messung 15,3 % O₂ betrug, was einer 2,5-fachen Erhöhung entsprach und das bei gleicher Zellzahl und Zelllinie. Der einzige Unterschied lag in der Zellpassage. Für diese Messung unter Hypoxie wurde auf Grund einer Kontamination in der Zellkultur eine neue Passage benutzt, während bei den anderen Messungen ältere Zellpassagen verwendet wurden, welche schon über mehrere Wochen in Kultur waren. Möglicherweise hatte die neue Zellpassage einen erhöhten Sauerstoffbedarf. Bestätigt würde dies durch die Beobachtung, dass Tumorzellen in Kultur allgemein deutlich geringere Sauerstoffverbrauchsraten zeigen als frisch isolierte primäre Tumorzellen [Wagner et al. 2011].

Die Analyse des Verlaufs der Metaboliten Glukose, Pyruvat und Laktat zeigte eine stark erhöhte anaerobe Glykolyse im normoxischen Abschnitt der Messung ([Abbildung 4.19](#), Seite 93). In den ersten 12 Stunden konnte eine Zunahme der Glykolyse-Rate beobachtet werden, während im Anschluss zunächst ein linearer Rückgang zu verzeichnen war. Während der Abnahme des Sauerstoffgehaltes ließ sich zunächst keine Beeinflussung auf die Metaboliten Glukose und Laktat feststellen. Der Verbrauch des Metaboliten Pyruvat endete jedoch abrupt mit der Verringerung der Sauerstoffkonzentration. Während der Hypoxie konnte zudem eine sprunghafte Abnahme der Glykolyse-Rate verzeichnet werden. Insgesamt betrachtet nahm der Rückgang der Glykolyse-Rate aber nach Erreichen der Hypoxie zunehmend weniger ab. Prinzipiell wäre zu erwarten gewesen, dass die Glykolyse-Rate während der hypoxischen Phase hochreguliert wird. Dem gegenüber steht natürlich die Abnahme der Zellvitalität, welche schon unter normoxischen Bedingungen gezeigt werden konnte. Andererseits sind Tumorzellen bekannt dafür auch unter normoxischen Bedingungen hoch glykolytisch zu sein (Warburg-Effekt), daher bestätigt diese Untersuchung diese Theorie, da keine starke Beeinflussung der Hypoxie auf die anaerobe Glykolyse nachgewiesen werden konnte. Lediglich Pyruvat zeigte eine deutliche Veränderung, allerdings wurde die Glykolyse dadurch offenbar nicht beeinflusst, wie der Laktat-Verlauf zeigte. Die sprunghafte Veränderung der Metaboliten Glukose und Laktat könnte zudem auch von einer Positionsänderung des Gelfadens im Messbereich stammen. Eine beobachtete leichte Veränderung der Linienbreite in den Spektren unterstützt diese Vermutung, da bei einer Lageveränderung des Agarosefadens die magnetische Homogenität der Probe beeinträchtigt werden würde.

Eine Beeinflussung des Glutamin-Verbrauchs durch die hypoxische Phase konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden ([Abbildung 4.19](#), Seite 93). Insgesamt wurde ein geringerer Verbrauch an Glutamin im Vergleich zur Pyro-Glutamat-Synthese im Sammelbehälter festgestellt. Dies lag an einer Überlagerung des Pyro-Glutamats mit einer unbekannten Resonanz bei ca. 2,40 ppm im Protonenspektrum. Aus Glutamin wurde zudem intrazellulär Glutamat gebildet, welches hier in der Perfusionskammer im Vergleich zum Medium erhöhte Werte aufwies. Im Laufe der Messung nahm dessen Stoffmenge pro Zeit dann ab und zu Beginn der hypoxischen Phase war dieser Abfall etwas erhöht. In der Phase des zunehmenden Sauerstoffgehaltes und der Normoxie blieb die gemessene Stoffmenge pro Zeit dann konstant und nahm nicht weiter ab. Da die Tumorzellen in diesem Fall zu Beginn auch sehr viel Sauerstoff verbrauchten und der Citratzyklus auf Grund der Kopplung zur Atmungskette nur unter aeroben Bedingungen durchlaufen werden kann, könnte Glutamin über Glutamat, α -

Ketoglutarat und den Citratzyklus auch zu Laktat verstoffwechselt worden sein. Dafür sprechen die höheren Glutamat-Werte in der Perfusionskammer und die hohe Laktat-Konzentration im Auffangbehälter, welche nur allein durch die anaerobe Glykolyse nicht erklärbar wäre. Zudem wäre somit der stärkere Abfall der Stoffmenge des Glutamats zu Beginn der hypoxischen Phase zu erklären.

Phenylalanin und Tyrosin zeigten einen zunehmenden aber geringen Verbrauch in der Perfusionskammer. Dabei konnte keine Beeinflussung durch die Hypoxie festgestellt werden. Die Zunahme des Verbrauchs dürfte wahrscheinlich hauptsächlich Überlagerungen und der Abnahme intrazellulärer Anteile zugeschrieben werden. Isoleucin demonstrierte dagegen einen abnehmenden Verbrauch während der normoxischen Phase und während der Hypoxie einen weiterhin reduzierten Verbrauch. Der erhöhte Verbrauch zu Beginn der Messung spricht dabei zusammen mit dem erhöhten Sauerstoffverbrauch für einen proliferativen Status der Zellen. Valin wies eine Zunahme der Stoffmenge pro Zeit auf, wie auch schon bei der Messung unter normoxischen Bedingungen, welche auch im Sammelbehälter detektiert werden konnte. Eine Beeinflussung durch die Hypoxie konnte auch hier nicht festgestellt werden. Die Zunahme der Valin-Stoffmenge pro Zeit könnte auch hier wieder auf den Abbau der Proteine zurückzuführen sein.

Die Analyse der makromolekularen Resonanzen zeigte eine starke Beeinflussung durch den Sauerstoffmangel. Die NMR-sichtbaren mobilen Proteine nahmen über die gesamte Messung um ca. 50 % ab ([Abbildung 4.20](#), Seite 96). Allerdings war die Abnahme in der normoxischen Phase noch nicht so stark ausgeprägt. Während des Sauerstoffabfalls in der Perfusionskammer zeigte sich dann eine sprunghafte Abnahme um ca. 13 %, gefolgt von einem linearen Abfall. In der abschließenden normoxischen Phase zeigte sich dagegen eine Zunahme von ca. 8 %. Dies würde für eine erhöhte Proteolyse in der Phase des Sauerstoffabfalls sprechen und dementsprechend auf eine kurzfristige Zunahme der Apoptose. Die leichte Zunahme am Ende würde auf eine beginnende Proteinsynthese durch die Rückkehr zu normoxischen Bedingungen hindeuten. Bei den mobilen Lipiden zeigte vor allem die Resonanz der Methylengruppe (ML2) eine verstärkte Zunahme während der Abnahme des Sauerstoffgehalts in der Perfusionskammer. Zusammen mit der Methingruppe (ML6) wiesen diese beiden Lipidresonanzen den stärksten Anstieg aller mobilen Lipide auf. Auch dies spricht für eine Zunahme des apoptotischen Anteils der Zellen. Ab dem Erreichen der Hypoxie war für alle mobilen Lipide ein identisches Verhalten zu beobachten, d.h. die Verhältnisse der Lipide untereinander blieben gleich. Sie zeigten eine deutliche Abschwächung des Anstiegs und nach Zunahme des Sauerstoffgehaltes erreichten die Lipide ein nahezu konstanten Wert. Dies würde bedeuten, dass die Tumorzellen nach Erreichen der Hypoxie in einen ruhenden Zustand übergingen, wodurch die Lipidsynthese reduziert wurde. Die konstanten Verhältnisse der Lipide nach Erreichen der Hypoxie spricht zudem für eine Abnahme der Apoptose, da das Lipidverhältnis ML2/ML1 gut mit dem Anteil an apoptotischen Zellen korreliert [Di Vito et al. 2001; Ramm et al. 2011].

Insgesamt zeigte die Analyse der Metaboliten ein Bild von zu Beginn noch mehr Richtung proliferativen Status agierenden Zellen, welche dann noch in der normoxischen Phase ein Maximum der Glykolyse erreichte. Die hypoxische Phase zeigte kaum Auswirkungen auf die

untersuchten niedermolekularen Metaboliten und die anschließende Erhöhung des Sauerstoffgehaltes auf normoxische Bedingungen führte zu einer Abflachung der Änderungen von Glukose, Laktat, Glutamat, Phenylalanin, Tyrosin und Valin. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Tumorzellen auf Grund des Mangels an fötalem Kälberserum schon während der normoxischen Phase in einen ruhenden Zustand übergingen. Daher zeigten die Glioblastom-Zellen beim Übergang in die hypoxische Phase auch keine große Veränderung der Glykolyse-Rate, da die Zellen bereits weitestgehend in einem quieszenten Zustand waren. Dennoch war die Reduzierung des Sauerstoffgehaltes eine Stresssituation für die Zellen, was durch den zunächst verstärkten Anstieg der Methylenresonanz (ML2) der mobilen Lipide verdeutlicht wurde. Zudem war der Proteinabbau zu diesem Zeitpunkt ebenfalls erhöht, was außerdem für eine verstärkte Apoptose spricht. Interessant ist zudem die Betrachtung der Sauerstoffverbrauchsrate, welche zu Beginn einen Wert von $2,8 \% \text{ O}_2 / 1 \cdot 10^6$ Zellen ergab. Am Ende der Messung lag dieser Wert aber nur noch bei $1,8 \% \text{ O}_2 / 1 \cdot 10^6$ Zellen, was auch der durchschnittlichen Sauerstoffverbrauchsrate für die Zellen der Zelllinie HTZ-349 entsprach. Daraus kann geschlossen werden, dass die Zellen auf die Umgebungsbedingungen reagiert haben und ihren Sauerstoffverbrauch, trotz aerober Bedingungen am Ende der Messung, reduziert haben. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Zellen auf Grund des Sauerstoffmangels in einen metabolisch ruhenden Zustand übergingen.

5.2.4 HTZ-349 unter Perfusion bei Variation des pH-Wertes

Bei der Untersuchung der metabolischen Auswirkung von pH-Stress auf die humane Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 konnten deutliche Veränderungen in den unterschiedlichen pH-Phasen festgestellt werden. Die Zellen wurden dabei zunächst unter sauren, dann unter physiologischen und schließlich erneut unter sauren Bedingungen untersucht, wobei sich stärkere Auswirkungen in der zweiten sauren Phase zeigten. Dies lag hier zum einen an einer dichten Packung der Zellen innerhalb der Perfusionskammer auf Grund einer geringeren Stabilität des Agarosefadens und einer hohen Laktat-Synthese. Durch die Perfusion und Schwerkraft wurden die Zellen daher im Messbereich komprimiert, wodurch sich in diesem Fall durch hohe Laktat-Stoffmengen in der Perfusionskammer eine Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich ergab. Dadurch wurde der effektive pH-Wert im Messbereich beeinflusst, der durch die Änderung der chemischen Verschiebung der Histidin-Resonanzen bestimmt wurde. Dies galt allerdings für die gesamte Messung und daher für alle Phasen. Ein zweiter Faktor, welcher zu einer stärkeren metabolischen Antwort der zweiten sauren Phase führte war, dass letztlich der gesamte pH-Wert bestehend aus dem Wert des vorbeifließenden Mediums und dem des Agarosefadens gemessen wurde. Wie bereits in [Kapitel 4.3.4](#) beschrieben, war der pH-Wert des Mediums auf Grund der Begasungskonzentration des CO_2 in der ersten Phase physiologisch, in der zweiten Phase basisch und in der letzten Phase sauer. Dies erklärt warum die metabolische Reaktion der Zellen in der letzten Phase stärker ausfielen als in der ersten Phase, obwohl sich die effektiven pH-Werte im Messbereich fast nicht unterschieden. Zudem war die Laktat-Synthese zu Beginn der Messung auf Grund des sicher

größeren Anteils an vitalen Zellen höher als in der letzten Phase. Deswegen war der resultierende effektive pH-Wert in der Perfusionskammer im letzten Abschnitt der Messung etwas weniger sauer als in der ersten Phase, trotz Begasung mit 20 % CO₂. Diese Messung zeigte daher zusätzlich einen weiteren Optimierungsbedarf der Immobilisationsmethode der Zellen in der Perfusionskammer.

Am stärksten wurde die anaerobe Glykolyse durch die pH-Stressphasen beeinträchtigt, da dort die Stoffmengenänderungen pro Zeit von Glukose und Laktat im Vergleich zum Medium niedriger waren als in der physiologischen Phase ([Abbildung 4.22](#), Seite 102). Pyruvat zeigte dagegen keinen Verbrauch in dem physiologischen Abschnitt und einen erhöhten Verbrauch in den Stressphasen, also das entgegengesetzte Verhalten zu Glukose. Das lag in diesem Fall an der starken Überlagerung mit der Resonanz von Glutamat, welche durch die Verschiebung der pH-Werte in den Stressphasen zusätzlich verstärkt wurde.

Glutamin zeigte auf Grund der spontanen Umwandlung zu Pyro-Glutamat eine erwartete Zunahme im Laufe der Zeit. Im physiologischen Bereich war allerdings ein deutlich erhöhter Verbrauch an Glutamin zu beobachten ([Abbildung 4.22](#), Seite 102). Passend dazu war in dieser Phase auch Glutamat erhöht, welches das Ausgangsprodukt der Glutaminolyse darstellt. Der Verlauf des Pyro-Glutamats wies in der physiologischen Phase ebenfalls leicht erhöhte Werte und einen konstanten Verlauf in der ersten sauren Phase auf, während im zweiten sauren Abschnitt eine leichte Zunahme zu verzeichnen war. Aus der Analyse der Umwandlung von Glutamin zu Pyro-Glutamat konnte geschlossen werden, dass Glutamin hauptsächlich während der physiologischen Phase zusätzlich von den Zellen verbraucht wurde ([Abbildung 4.31 B](#), Seite 125). Insgesamt betrachtet wurden allerdings 98 % des verbrauchten Glutamins zu Pyro-Glutamat umgewandelt.

Der Verlauf der Stoffmenge pro Zeit von Pyro-Glutamat wurde durch zwei Faktoren beeinflusst. Zum einen war der pH-Wert des Mediums entscheidend, da nach Gilbert et al. [Gilbert et al. 1949] die spontane Umwandlung von Glutamin zu Pyro-Glutamat maßgeblich davon abhängt. Die Umwandlungsrate ist am stärksten bei basischem pH und am schwächsten bei saurem pH. Da in drei Tagen etwas weniger als 20 % des gesamten im Medium enthaltenen Glutamins zu Pyro-Glutamat umgewandelt wurden ist davon auszugehen, dass der pH-Wert innerhalb der Perfusionskammer, in der das Medium nur ca. 20 min verweilte, keine Rolle bei der Umwandlung gespielt hat. Daher war der pH-Wert des Mediums im Inkubator der entscheidende Faktor. Demnach war die Umwandlung in der zweiten Phase (basischer pH im Medium) am stärksten und in der letzten Phase (saurer pH im Medium) am schwächsten. Dies erklärt die erhöhten Werte des Pyro-Glutamats während der zweiten Phase und den leichten Rückgang in der letzten Phase. Zudem spielten hier aber auch Überlagerungen von Glutamin und Pyro-Glutamat innerhalb der Perfusionskammer in den sauren Phasen eine Rolle. Durch eben diese Überschneidung der Resonanzen hob sich die Zunahme des Pyro-Glutamats durch die Abnahme des Glutamins auf und es ergaben sich nahezu konstante Werte in der Perfusionskammer.

Cholin zeigte, wie bei Tumorzellen erwartet [Glunde et al. 2011], erhöhte Werte in der Perfusionskammer ([Abbildung 4.22](#), Seite 102). In der physiologischen Phase nahm die gemessene Stoffmenge pro Zeit ab. Eine mögliche Erklärung der erhöhten Werte in den sauren Phasen wäre der Abbau der Lipidmembranen über Glycerophosphocholin zu Cholin in Folge

des pH-Stresses. Im physiologischen Bereich könnte eine zelluläre Aufnahme des im Medium enthaltenen Cholins die insgesamt gemessene Stoffmenge pro Zeit in der Perfusionskammer erniedrigt haben. Die Folge wäre dann eine intrazelluläre Umwandlung zu Phosphocholin, welches ein Zwischenprodukt für die Lipidsynthese darstellt. Leider konnte dies nicht überprüft werden, da die Resonanzen von Phosphocholin und Glycerophosphocholin überlagerten und somit nicht getrennt analysiert werden konnten. Die geringe Konzentrationsabnahme von 11 μM des Cholins im Sammelbehälter bestätigt eine zelluläre Aufnahme.

Die restlichen analysierten Aminosäuren zeigten bis auf Valin ein identisches Verhalten. Isoleucin, Phenylalanin und Tyrosin wiesen einen minimalen Verbrauch sowohl in der Perfusionskammer als auch im Auffangbehälter auf. Der Verlauf in der Perfusionskammer verdeutlichte, dass der Verbrauch hauptsächlich auf die physiologische Phase beschränkt war. Der tatsächliche Unterschied in den verschiedenen pH-Phasen wäre sogar noch größer, da diese drei Aminosäuren auf Grund der Veränderung der chemischen Verschiebung in den sauren Phasen mit umgebenden Resonanzen überlagerten, so dass der tatsächliche Verbrauch in diesen Abschnitten geringer war. Valin dagegen zeigte erhöhte Werte in den sauren Phasen, wie auch schon bei den Perfusionsexperimenten zuvor, aber im physiologischen Abschnitt konnte ein minimaler Verbrauch in der Perfusionskammer nachgewiesen werden. Auch im Sammelbehälter wurde eine geringfügige Konzentrationsabnahme von 9 μM ermittelt. Die erhöhten Werte in den sauren Phasen könnten dabei von einer Proteolyse stammen, die durch den pH-Stress ausgelöst wurde. Dementsprechend würde in der physiologischen Phase die Verwendung Valins zur Proteinsynthese, oder als Kohlenstoffquelle für den Citratzyklus eine mögliche Erklärung bieten.

Die Analyse der makromolekularen Resonanzen passt zu dem Bild, dass die untersuchten niedermolekularen Metaboliten zeigten. Die NMR-sichtbare mobile Proteinresonanz M7 wies über die gesamte Messung eine Abnahme um 53 % auf und beim Übergang in den physiologischen Bereich konnte eine verminderte Abnahme festgestellt werden ([Abbildung 4.23](#), Seite 104). Insgesamt betrachtet spricht dies für einen Proteinabbau, welcher zu Beginn der physiologischen Phase reduziert war. Die mobilen Lipide zeigten in der physiologischen Phase einen Rückgang, was für einen zunehmenden Lipidabbau und einem damit verbundenen erhöhten Lipidmetabolismus sprechen würde. Die Verhältnisse der mobilen Lipide wiesen über die gesamte Messung einen identischen Verlauf der Methylen- und der Methingruppe auf. Insgesamt zeigten diese beiden Lipidresonanzen im Vergleich zu den restlichen mobilen Lipiden einen stärkeren Anstieg in den sauren Phasen. Im physiologischen Abschnitt waren dagegen die Verhältnisse aller Lipidresonanzen identisch.

Der Verlauf des Sauerstoffverbrauchs zeigte wie bei allen Perfusionsversuchen mit den humanen Glioblastom-Zellen ohne fötales Kälberserum insgesamt ein abnehmendes Verhalten ([Abbildung 4.21](#), Seite 99). Hier konnte im physiologischen Abschnitt in der ersten Hälfte eine verminderte Zunahme und im zweiten Teil sogar ein konstantes Verhalten nachgewiesen werden. In der nachfolgenden sauren Phase nahm der Sauerstoffverbrauch und die damit zusammenhängende Zellvitalität wieder stärker ab. Zusammen mit der

metabolischen Analyse gibt dies ein stimmiges Gesamtbild und spricht für eine deutliche Beeinflussung des Tumorzellmetabolismus durch den pH-Stress.

5.3 Interpretation und Vergleich der metabolischen Analyse der unbehandelten und mit Antisense Oligonukleotid behandelten humanen neuralen Stammzelllinie ReNCX

Nach der Überprüfung der Messparameter für die humane neurale Stammzelllinie ReNCX konnten die Zellen unter der Voraussetzung physiologischer pH-Werte und mit einem Korrekturfaktor für die Sauerstoffmessung im bestehenden Perfusions-System verwendet werden. Dies zeigte die vielfältige Einsatzmöglichkeit des Perfusions-Systems mit einem relativ geringen Aufwand an Vorbereitungen. Insgesamt wurden zwei Perfusionsmessungen mit den neuronalen Stammzellen unter identischen Messbedingungen durchgeführt. Der einzige Unterschied in beiden Messungen bestand in einer 4-tägigen Vorbehandlung der Stammzellen mit 10 μM eines Antisense Oligonukleotids, dass wie in [Kapitel 2.5](#) beschrieben die Expressionsrate des TGFRII Rezeptors reduzieren sollte. Die Zellen wurden jeweils unter normoxischen Bedingungen über 72 Stunden bei einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ metabolisch analysiert.

Insgesamt betrachtet zeigten die Zellen in beiden Messungen wie erwartet einen ähnlichen metabolischen Verlauf. Dies galt sowohl für die niedermolekularen Metaboliten als auch für die mobilen Proteine und Lipide. Die Analyse der Glykolyse ergab eine höhere Rate im Fall der unbehandelten Zellen, was sich in einem größeren Gesamtverbrauch an Glukose im Sammelbehälter zeigte. Zusätzlich war auch die Laktat-Synthese im unbehandelten Fall höher. Nach Abzug des für die Laktat-Synthese verwendeten Anteils war der Glukose-Verbrauch für andere zelluläre Prozesse in beiden Fällen aber ungefähr gleich. Pyruvat zeigte dagegen bei beiden Messungen keine Veränderung im Sammelbehälter, aber erhöhte Werte in der Perfusionskammer, statt eines erwarteten Verbrauchs. Dies lag hauptsächlich an einer Überlagerung mit der Resonanz des Glutamats. Insgesamt lässt sich über den Glukose-Verbrauch allein keine klare Aussage über den Zustand der Zellen treffen, da der Gesamtverbrauch an Glukose für Prozesse außer der Laktat-Synthese bei beiden Messungen ungefähr gleich war. Die stärkere Laktat-Synthese im unbehandelten Fall könnte eventuell auf einen größeren Anteil ruhender Zellen schließen lassen.

Glutamin war auf Grund einer Überlagerung mit HEPES in der ersten Hälfte der Messung und im Sammelbehälter schwer auszuwerten. Insgesamt betrachtet ergab sich aber, wie auch schon bei den Tumorzellen, eine kontinuierliche Zunahme des Verbrauchs auf Grund der spontanen Umwandlung von Glutamin zu Pyro-Glutamat ([Abbildung 4.25](#), Seite 111 und [Abbildung 4.28](#), Seite 118). Zudem ließ sich im Fall der behandelten Stammzellen eine verstärkte Abnahme der Stoffmengendifferenz des Glutamins zu Beginn feststellen, welche nach 6 Stunden ihr Minimum erreichte, bevor sie auf Grund der nicht-enzymatischen

Umwandlung wieder anstieg. Bei den unbehandelten Zellen könnte nach Abzug der Überlagerung ebenfalls ein Verbrauchsminimum zu Beginn existiert haben. In der zweiten Hälfte zeigte sich eine klare Zunahme des Verbrauchs. Glutamat zeigte dagegen in beiden Messungen nach etwa 12 Stunden ein Maximum in der Perfusionskammer. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Metaboliten Phenylalanin und Tyrosin einen reduzierten Verbrauch auf. Insgesamt betrachtet spricht dies für eine Phase zu Beginn der Messung, in der weniger Glutamin, Phenylalanin und Tyrosin verbraucht wurden und Glutamat sich intrazellulär angesammelt an, woraus eine Abnahme der Proliferationsrate in diesem Zeitraum interpretiert werden kann. Unterstützt würde diese Vermutung durch die erhöhte Laktat-Synthese und dem Anstieg der mobilen Lipide in beiden Fällen, was für eine Ansammlung an Lipiden auf Grund eines Rückgangs des Verbrauchs schließen ließe ([Abbildung 4.26](#), Seite 113 und [Abbildung 4.29](#), Seite 121). Der Sauerstoffverbrauch zeigte bei beiden Messungen ebenfalls eine Abnahme zwischen 10 - 30 Stunden ([Abbildung 4.24](#), Seite 108 und [Abbildung 4.27](#), Seite 116). Der Anstieg der mobilen Proteine im ersten Zeitintervall und die anschließend annähernd gleichbleibenden Werte würden für eine Abnahme der Proteinsynthese und damit ebenfalls für eine Abnahme der Proliferationsrate sprechen. Das Maximum der mobilen Proteinresonanz M7, lag dabei im Fall der unbehandelten Zellen bei einem um 30 % erhöhten Ausgangswert, während sich der mobile Proteinanteil im behandelten Fall um 67 % erhöht hatte. Die Proteinsynthese war also zu Beginn der Messung bei den behandelten Zellen stärker ausgeprägt.

Isoleucin wurde bei beiden Messungen durch die starke Methylresonanz der mobilen Lipide überlagert. Daher ergaben sich in der Perfusionskammer höher Werte im Vergleich zum Medium ([Abbildung 4.25](#), Seite 111 und [Abbildung 4.28](#), Seite 118). Im Sammelbehälter konnte jedoch keine Veränderung dieses Metaboliten festgestellt werden. Im Gegensatz zu Valin, denn bei dieser Aminosäure konnte in beiden Fällen eine nahezu identische Zunahme im Sammelbehälter ermittelt werden. In der Perfusionskammer ergaben sich bei beiden Messungen erhöhte Werte im Vergleich zum Medium, welche im zeitlichen Verlauf weiter zunahmen. Abweichungen in den ermittelten Stoffmengen bei den zwei Messungen sind dabei auf unterschiedlich starke Überlagerungen mit der Methylenresonanz der mobilen Lipide zurückzuführen. Die Zunahme der Stoffmengen im Laufe der Zeit bei Valin spricht für einen kontinuierlichen Anstieg einer Proteolyse. Dies deckt sich mit der Abnahme der mobilen Proteine im Laufe der Messung, welche im Falle der unbehandelten Zellen wieder auf das Ausgangsniveau zurückfielen und bei den behandelten Zellen im Vergleich zum Beginn der Messung immer noch um 18 % erhöht war.

Cholin zeigte bei beiden Messungen einen geringen Verbrauch im Sammelbehälter. Im zeitlichen Verlauf in der Perfusionskammer konnten in beiden Fällen erhöhte Werte im Vergleich zum Medium festgestellt werden, welche nach einem Maximum im Bereich von 6 – 18 Stunden kontinuierlich abnahmen und bei den behandelten Zellen im Laufe der Messung in einen geringen Verbrauch übergingen ([Abbildung 4.25](#), Seite 111 und [Abbildung 4.28](#), Seite 118). Die erhöhten Stoffmengen in der Perfusionskammer in Kombination mit dem Verbrauch im Auffangbehälter sprechen in beiden Fällen für intrazelluläre Anteile, welche in der Perfusionskammer für die vergrößerten Werte verantwortlich waren. Offenbar war der intrazelluläre Verbrauch im zeitlichen Verlauf bei den behandelten Zellen größer. Wegen der möglichen intrazellulären Umwandlung von Cholin zu Phosphatidylcholin würde die die

stärkere Abnahme der Stoffmenge des Cholins für eine erhöhte Lipidsynthese im Vergleich zu den unbehandelten Zellen sprechen. Der erhöhte intrazelluläre Anteil an Cholin in der ersten Hälfte der Messung würde dementsprechend einen verringerten Bedarf der Zellen an Lipiden beschreiben. Das könnte auch den Anstieg der mobilen Lipide in dieser Phase erklären, da sich die Lipide in der Zelle auf Grund eines verringerten Verbrauchs akkumuliert haben könnten.

Tatsächlich nahm der Anteil der NMR-sichtbaren mobilen Lipide vor allem in der ersten Hälfte der Messungen zu ([Abbildung 4.26](#), Seite 113 und [Abbildung 4.29](#), Seite 121). Die Lipidverläufe zeigten insgesamt betrachtet in beiden Messungen ein ähnliches Verhalten. Zuerst konnte ein verstärkter Anstieg aller Lipide festgestellt werden, welcher dann zunehmend abflachte, oder teilweise sogar in ein leicht abnehmendes Verhalten überging. Dabei zeigten die Verhältnisse der Lipide im Vergleich zur Methylenresonanz nach einem anfänglichen Abfall ab etwa 30 Stunden keine Veränderung mehr. Die Lipidresonanz ML3 – eine Resonanz gesättigter Fettsäuren – wies den ähnlichsten Verlauf im Vergleich zur Methylenresonanz auf. Der Verlauf der Lipide unterschied sich damit klar von dem Verhalten im Fall der Tumorzellen. Dort stieg die Methylenresonanz ML2 im Vergleich zu den anderen mobilen Lipiden wesentlich stärker an. Zudem war der Verlauf der Resonanz der Methingruppe (ML6) bei den Tumorzellen dem Verlauf von ML2 am nächsten. In der Literatur wird das Verhältnis der Lipidresonanzen ML2/ML1 als gut korrelierendes Maß mit dem Anteil an apoptotischen Zellen beschrieben [Di Vito et al. 2001; Ramm et al. 2011]. Ein Vergleich des Anstiegs dieses Verhältnisses unter normoxischen Bedingungen zeigt eine 4,2-fache Zunahme bei den Glioblastom-Zellen und nur eine 1,3-fache Zunahme in beiden Fällen der neuralen Stammzellen. Dies spricht im Fall der neuralen Stammzellen klar für einen wesentlich geringeren Anteil apoptotischer Zellen. Zudem hatten die Tumorzellen keine Wachstumsfaktoren zur Verfügung wodurch die Apoptose in diesem Fall begünstigt wurde.

Trotz relativ gleichbleibender Verhältnisse untereinander zeigten alle Lipidresonanzen der behandelten Stammzellen auf den Ausgangswert normiert einen etwas stärkeren Anstieg mit einer durchschnittlichen Erhöhung um das 3,1-fache als die mobilen Lipide der unbehandelten Stammzellen, welche nur um das 2,4-fache anstiegen. Der um ca. 30 % stärkere Anstieg der mobilen Lipide bei gleichem Verhältnis untereinander deutet auf eine etwas erhöhte Lipidsynthese im behandelten Fall hin. Die Resonanzen der Methingruppe (ML6) und der Methylengruppe (ML2) waren im behandelten Fall minimal erhöht, was außerdem für einen etwas größeren Anteil an apoptotischen Zellen im Fall der behandelten Zellen stehen würde. Die tatsächliche Intensität der Lipidresonanzen war dagegen bei den unbehandelten Zellen im Schnitt um das 2,4-fache erhöht. Aus dieser erhöhten Lipidintensität lässt sich folgern, dass bei den unbehandelten Zellen eine größere Anzahl an Zellen im messsensiblen Bereich vorhanden war. Dies könnte sowohl an einer dichteren Packung des Agarosefadens und/oder an einer erhöhten Proliferationsrate liegen.

Der Verlauf des Sauerstoffverbrauchs war im Fall der unbehandelten Zellen relativ konstant und zeigte innerhalb der Fehlergrenzen keine Änderung über die gesamte Messung. Zu Beginn lag der Sauerstoffverbrauch bei 7,0 % O₂, nach ca. 10 Stunden wurde ein Maximum von 7,4 % O₂ erreicht, dann fiel der Verbrauch bis ca. 30 Stunden auf 5,9 % O₂ und nach 72 Stunden lag er dann schließlich bei 6,6 % O₂. Im Unterschied zu den Tumorzellen waren im Medium der Stammzellen Wachstumsfaktoren enthalten. Dies erschwerte die Bestimmung der

Sauerstoffverbrauchsrate, da die genaue Anzahl an lebenden Zellen nach Beendigung der Messungen nicht bestimmt werden konnte. Durch den Trypanblau-Test konnte bei den unbehandelten Zellen ein prozentualer Anteil von 65 % an vitalen Zellen am Ende der Messung bestimmt werden. Durch die Fähigkeit zur Proliferation und dem Verlauf des Sauerstoffverbrauchs ist aber davon auszugehen, dass sich die Gesamtzahl an Zellen in der Perfusionskammer verändert hatte. Ausgehend von der Annahme einer konstanten Sauerstoffverbrauchsrate und unter Berücksichtigung des prozentualen Anteils an vitalen Zellen hätte sich in diesem Fall eine Gesamtzahl von 8,2 Millionen Zellen am Ende der Messung ergeben. Dementsprechend hätten sich die Zellen im unbehandelten Fall in den 72 Stunden um 2,2 Millionen Zellen vermehrt. Bei den mit Antisense Oligonukleotid behandelten Zellen lag der Sauerstoffverbrauch zu Beginn bei nur 4,6 % O_2 , welcher bis ca. 27 Stunden auf ca. 3,2 % O_2 abfiel und ab diesen Zeitpunkt bis zum Ende ungefähr konstant blieb. Bei einer gleichbleibenden Sauerstoffverbrauchsrate, welche hier um 35 % niedriger war und einem prozentualen Anteil an lebenden Zellen von 58 % wären daher nach 72 Stunden eine Gesamtzahl von 6,8 Millionen Zellen in der Perfusionskammer vorhanden gewesen. Demnach hätten sich die Gesamtzellzahl in diesem Fall nur um 800.000 Zellen vermehrt. Allerdings sind dies nur grobe Näherungen und Messungen mit den Glioblastom-Zellen zeigten, dass Zellen unter durchaus in der Lage sind ihre Sauerstoffverbrauchsrate im Laufe einer Messung und zu ändern. Zudem können die neuralen Stammzellen in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten ausdifferenzieren und deren Sauerstoffverbrauch unterscheidet sich vermutlich von dem Bedarf der Stammzellen. Dementsprechend könnte die 4-tägige Vorbehandlung mit dem Antisense Oligonukleotid die neuralen Stammzellen bereits auch schon mehr zur Ausdifferenzierung bewegt haben und möglicherweise war deswegen bei gleicher Zellzahl der Sauerstoffverbrauch geringer.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die neuralen Stammzellen in beiden Fällen ein ähnliches metabolisches Verhalten zeigten. Die unbehandelten Zellen verbrauchten dabei mehr Sauerstoff, zeigten einen geringfügig höheren prozentualen Anteil an lebenden Zellen am Ende der Messung und über die Sauerstoffverbrauchsrate konnte eine größere Gesamtzellzahl errechnet werden. Zudem war der Anstieg der mobilen Lipide um ca. 30 % kleiner als bei den behandelten Zellen, was für einen stärkeren Lipidumsatz im unbehandelten Fall sprechen würde. Außerdem deckte sich der Anstieg der mobilen Lipide mit einer Abnahme des Sauerstoffgehaltes in beiden Fällen, was auf eine abnehmende Proliferation und einer vermehrten Speicherung der Lipide hindeuten würde. Aus diesen Ergebnissen könnte gefolgert werden, dass die unbehandelten Zellen insgesamt eine stärkere Proliferation zeigten. Andererseits zeigte der starke Anstieg der mobilen Proteine zu Beginn der Messung eine deutlich höhere Proteinsynthese im Fall der behandelten Zellen. Der Anteil an apoptotischen Zellen, welche aus dem Verhältnis ML2/ML1 geschlossen wurden, waren im behandelten Fall nur minimal höher. Die stärkere intrazelluläre Abnahme des Cholins bestätigt eine höhere Lipidsynthese bei den behandelten Stammzellen und die erhöhten Lipidwerte, bei ähnlichem ML2/ML1-Verhältnis, könnten vor allem in Bezug auf den höheren Proteinanteil auch auf eine größere Zellzahl in der Perfusionskammer zurückzuführen sein. Eine Vorbehandlung mit dem Antisense Oligonukleotid könnte die Stammzellen zu einer verstärkten Ausdifferenzierung angetrieben haben, weswegen sich keine klare Aussage über den Nährstoff- und Sauerstoffverbrauch treffen lässt, was durch die deutlich niedrigere

Sauerstoffverbrauchsrate im behandelten Fall bestätigt würde. Zudem ist eine erhöhte Lipidsynthese, wie in [Kapitel 2.4.2](#) erwähnt, auch bei proliferierenden Zellen der Fall. Daher wäre es auch möglich, dass die behandelten Zellen proliferativer waren. Ergebnisse der Arbeitsgruppe Neurodegeneration/ALS des Lehrstuhls für Neurologie am Uniklinikum Regensburg zeigten, dass durch eine Behandlung der neuralen Stammzellen der Zelllinie ReNCX mit dem Antisense Oligonukleotid tatsächlich sowohl die Proliferation, als auch die Ausdifferenzierung erhöht wird. Zudem ist zu erwähnen, dass diese Beeinflussung durch das Antisense Oligonukleotid dabei auch ohne Gegenwart von TGF-beta sichtbar war, denn das hier verwendete Perfusionsmedium enthielt kein TGF-beta. Der Unterschied in der Proliferation und Ausdifferenzierung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen ist in Gegenwart von TGF-beta aber deutlich stärker.

Für eine genaue Analyse sind daher weitere Experimente notwendig, da aus der einen Vergleichsmessung keine klaren Schlüsse gezogen werden konnten. Zudem sollte auch die Auswirkung der Zugabe von TGF-beta auf unbehandelte und behandelte Zellen getestet werden, um die tatsächliche Wirkung der reduzierten Rezeptor-Expression metabolisch zu untersuchen.

5.4 Vergleich der metabolischen Analyse der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 mit der humanen neuralen Stammzelllinie ReNCX

Insgesamt betrachtet zeigten sich, wie erwartet, deutliche Unterschiede zwischen dem metabolischen Verhalten der Glioblastom-Zellen ohne Perfusion im Vergleich zu den Zellen unter kontinuierlicher Perfusion. Aber auch zwischen den Tumorzellen und den neuralen Stammzellen waren einige metabolische Veränderungen festzustellen. Die Betrachtung des Verlaufs der mobilen Lipide zeigte im Fall der Tumorzellen ohne Perfusion zunächst einen Anstieg, welcher nach Erreichen eines Maximums wieder ungefähr auf das Ausgangsniveau zurückfiel. Dieselbe Zelllinie unter Perfusion zeigte dagegen einen kontinuierlichen Anstieg der mobilen Lipide bis zum Ende der Messung. Unter Hypoxie flachte die Zunahme etwas ab und bei pH-Stress war die Zunahme im Vergleich zur physiologischen Phase erhöht. Die neuralen Stammzellen wiesen in der ersten Hälfte der Messungen einen kontinuierlichen Anstieg auf, der dann in eine konstante Phase bis zum Ende der Messung überging und teilweise gegen Ende geringfügig abnahm. Interessant ist dabei das Verhältnis der Methylen- zur Methyresonanz (ML2/ML1), welches eine gute Korrelation zum Anteil apoptotischer Zellen zeigt [Di Vito et al. 2001; Ramm et al. 2011]. In [Abbildung 5.2](#) ist der Verlauf dieses Verhältnisses für alle Messungen dargestellt.

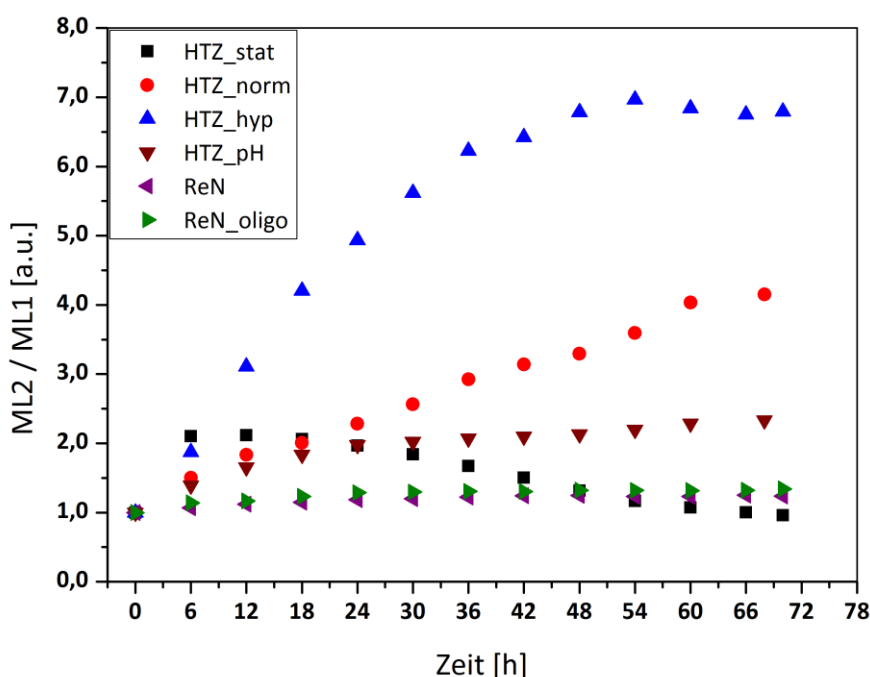


Abbildung 5.2 Verlauf des mobilen Lipidverhältnisses ML2/ML1 für die Messungen mit der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 und der humanen neuronalen Stammzelllinie ReNCX. Grundlage für die Abbildung waren Integrale der Methylenresonanz (ML2) und der Methylresonanz (ML1) aus diffusionsgewichteten ^1H -Spektren bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Das Verhältnis ML2/ML1 korreliert mit dem Anteil an apoptotischen Zellen. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: b -Wert = $7,4 \cdot 10^9 \text{ s}/\text{m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = 0,51 T/m. Der Gradient wurde so gewählt, dass die niedermolekularen Anteile abgeschwächt wurden. Abkürzungen: HTZ_stat = statische Messung mit den Glioblastom-Zellen, HTZ_norm = Perfusionsmessung mit den Glioblastom-Zellen unter normoxischen Bedingungen, HTZ_hyp = Perfusionsmessung mit den Glioblastom-Zellen unter hypoxischen Bedingungen, HTZ_pH = Perfusionsmessung mit den Glioblastom-Zellen unter pH-Stress, ReN = Perfusionsmessung mit den neuronalen Stammzellen unter normoxischen Bedingungen, ReN_oligo = Perfusionsmessung mit den neuronalen Stammzellen unter normoxischen Bedingungen und einer Vorbehandlung mit dem Antisense Oligonukleotid

Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit der zeitlichen Entwicklung auf den jeweiligen Ausgangswert normiert. Für die Glioblastom-Zellen zeigte sich prinzipiell ein ähnliches Verhalten von ML2/ML1 wie schon im zuvor beschriebenen Gesamtverlauf aller mobilen Lipide. Dies lag an dem stärkeren Anstieg der Methylengruppe im Vergleich zu den meisten anderen mobilen Lipiden bei den Tumorzellen. Lediglich die Resonanz der Methingruppe ML6 zeigte eine ähnliche Zunahme wie die Methylengruppe. Im Fall der Stammzellen ergab sich zwar ebenfalls ein ähnlicher Verlauf des Verhältnisses ML2/ML1 im Vergleich zum Verhalten der restlichen mobilen Lipide, aber der Anstieg des Verhältnisses war deutlich weniger stark ausgeprägt als bei den Tumorzellen. Der Grund dafür war ein relativ ähnlicher Verlauf aller Lipidresonanzen inklusive der Methylenresonanz ML2. In [Tabelle 5.1](#) sind die Maximalwerte des Verhältnisses ML2/ML1 dargestellt.

Tabelle 5.1 Auflistung der maximalen mobilen Lipidverhältnisse ML1/ML2 für die Messungen mit der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 und der humanen neuronalen Stammzelllinie ReNCX. Bei der statischen Messung mit den Glioblastom-Zellen war das Maximum des Verhältnisses nach 12 Stunden erreicht. Bei der Perfusionsmessung unter Hypoxie war das Maximum nach 54 Stunden am Ende der hypoxischen Phase erreicht und bei den restlichen Messungen stieg das Verhältnis bis zum Ende an. Grundlage dieser Tabelle waren die in [Abbildung 5.2](#) verwendeten Integrale. Abkürzung: AO steht für Antisense Oligonukleotid

Zelltyp	Bedingung	ML2/ML1 (max) [a.u.]
HTZ-349	Statisch	2,12
HTZ-349	Perfusion, Normoxie	4,15
HTZ-349	Perfusion, Hypoxie	6,96
HTZ-349	Perfusion, pH-Stress	2,33
ReNCX	Perfusion, Normoxie	1,25
ReNCX	Perfusion, Normoxie, AO	1,34

Der Verlauf des Verhältnisses ML2/ML1 zeigte klar, dass der Anteil apoptotischer Zellen im Fall der Tumorzellen höher lag als bei den neuronalen Stammzellen. Ein Grund für diesen Unterschied lag im Fehlen von Wachstumsfaktoren im Falle der Tumorzellen. Der geringfügige Anstieg des Lipidverhältnisses bei den Stammzellen zeigte, dass auf Grund der Möglichkeit zur Proliferation der apoptotische Anteil an Zellen nur minimal zunahm. Der Vergleich der Verhältnisse macht auch deutlich, dass die Hypoxie bei den Glioblastom-Zellen für einen größeren Anstieg des Anteils an apoptotischen Zellen verantwortlich war als der pH-Stress. Allerdings könnte das auch daran gelegen haben, dass die Zellen im Falle des Hypoxie-Versuchs im Vergleich zu den anderen Messungen mit den Glioblastom-Zellen wesentlich metabolisch aktiver waren. Vor allem benötigten die Tumorzellen bei dieser Messung ungewöhnlich große Mengen an Sauerstoff, wodurch diese starke Reaktion auf die hypoxische Phase erklärt werden könnte. Im statischen Versuch kann das Verhältnis ab dem Zeitpunkt des abnehmenden Verhaltens nicht mehr zum Vergleich mit der Apoptose herangezogen werden, da die mobilen Lipide auf Grund des Nährstoffmangels von den Tumorzellen für den Energiestoffwechsel verbraucht wurden. Was genau den starken Anstieg der Methylengruppe auslöst ist allerdings noch nicht bekannt. Offenbar ändert sich unter apoptotischen Bedingungen die Zusammensetzung der Lipidtröpfchen. Denkbar wäre eine Zunahme der Länge der Fettsäureketten, eine Abnahme des Anteils an CH₃-Gruppen, oder eine partielle Erhöhung der Mobilität.

Der Verlauf der mobilen Proteine, welche hier auf Grund der Überlagerungen mit den relativ starken Lipidresonanzen nur für die Resonanz M7 bei 2,99 ppm ausgewertet werden konnte, zeigte ebenfalls Unterschiede bei den verschiedenen Bedingungen und Zelltypen. Im statischen Fall der Glioblastom-Zellen blieb der Proteingehalt demnach nahezu konstant über die gesamte Messdauer, während die mobilen Proteine unter normoxischen Bedingungen um 44 %, bei Hypoxie um 50 % und bei pH-Stress um 53 % abnahmen. Dabei ist davon auszugehen, dass sich die gesamte Zellzahl während der Messung nicht verändert hat, da bei den Glioblastom-Zellen keine Wachstumsfaktoren enthalten waren. Bei den neuronalen Stammzellen dagegen zeigte sich zu Beginn ein Anstieg um 30 % im unbehandelten und um 67 % im mit Antisense Oligonukleotid behandelten Fall, welcher nach einer zunächst

annähernd konstanter Phase dann ebenfalls abnahm und auf das Ausgangsniveau beziehungsweise im behandelten Fall auf ca. 18 % des Ausgangswerts abfiel (Abbildung 5.3). Bei den Stammzellen waren Wachstumsfaktoren enthalten, so dass während der Messung Proliferation stattfinden konnte. Unter der Annahme einer konstanten Sauerstoffverbrauchsrate wurde über 72 Stunden eine Zunahme der Zellzahl um 2,2 Millionen Zellen im unbehandelten Fall und um 0,8 Millionen Zellen im behandelten Fall berechnet.

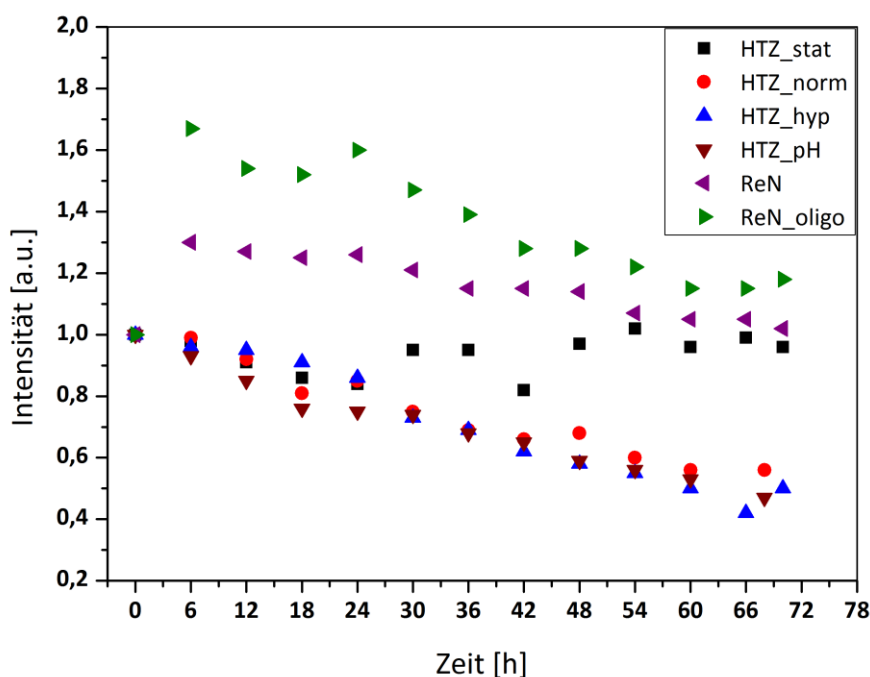


Abbildung 5.3 Verlauf der mobilen Proteinresonanz M7 bei 2,99 ppm für die Messungen mit der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 und der humanen neuralen Stammzelllinie ReNCX. Grundlage für die Abbildung waren diffusionsgewichtete ^1H -Spektren bei einer Resonanzfrequenz von 800 MHz, einer Temperatur von 37 °C und einer Perfusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Das verwendete Pulsprogramm war ein „diffu-oneshot“ mit jeweils folgenden Parametern: b -Wert = $7,4 \cdot 10^9 \text{ s}/\text{m}^2$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$, $\alpha = 0,2$ und Gradientenstärke = 0,51 T/m. Der Gradient wurde so gewählt, dass die niedermolekularen Anteile abgeschwächt wurden. Abkürzungen: HTZ_stat = statische Messung mit den Glioblastom-Zellen, HTZ_norm = Perfusionsmessung mit den Glioblastom-Zellen unter normoxischen Bedingungen, HTZ_hyp = Perfusionsmessung mit den Glioblastom-Zellen unter hypoxischen Bedingungen, HTZ_pH = Perfusionsmessung mit den Glioblastom-Zellen unter pH-Stress, ReN = Perfusionsmessung mit den neuralen Stammzellen unter normoxischen Bedingungen, ReN_oligo = Perfusionsmessung mit den neuralen Stammzellen unter normoxischen Bedingungen und einer Vorbehandlung mit dem Antisense Oligonukleotid

Im Fall der Tumorzellen unter Perfusion könnte die Abnahme des Proteingehaltes einer Proteolyse geschuldet sein, welche auch verstärkt in apoptotischen Zellen stattfindet [Solary et al. 1998]. Zudem zeigte auch der Sauerstoffverbrauch eine kontinuierliche Abnahme bei diesen Messungen, wodurch die kontinuierliche Abnahme des Proteingehaltes auf Grund eines zunehmenden Anteils apoptotischer Zellen unterstützt würde. Allerdings zeigte nur die Aminosäure Valin in allen Fällen eine erhöhte Konzentration im Auffangbehälter. Andere Aminosäuren wie Isoleucin, Phenylalanin und Tyrosin wiesen über die gesamte Messung niedrigere Stoffmengen pro Zeit auf als im Medium. Es könnte daher auch sein, dass die

Abnahme der mobilen Proteinresonanz M7 auf eine Abnahme der Beweglichkeit zurückzuführen ist. Eine Möglichkeit wäre, dass die mobilen Proteine im Laufe der Messung stärker gebunden wurden und somit in ihrer Mobilität behindert wurden.

Im Fall ohne Perfusion blieb der NMR-sichtbare Anteil an mobilen Proteinen konstant. Auf Grund der mehrfachen Stressfaktoren bei dieser Messung könnte eventuell eine Nekrose anstatt einer Apoptose der hauptsächlich verantwortliche Prozess für den Zelltod gewesen sein. Prinzipiell würden die Zellen bei einer Nekrose ihre Bestandteile an den extrazellulären Raum abgeben, aber die NMR-sichtbaren Proteine könnten auch hier in irgendeiner Form in der Zelle gebunden sein, da nur bewegliche Anteile von Proteinen notwendig sind um eine NMR-Sichtbarkeit zu gewährleisten. Leider ist über die mobilen Proteine bis heute nur wenig bekannt und die in der Literatur diskutierten möglichen Proteine, wie Thymosin β 4, oder Histon H1 (siehe [Kapitel 4.7](#)) kommen in unterschiedlichen Bereichen der Zelle vor. Dies zeigt die Notwendigkeit der genauen Charakterisierung der NMR-sichtbaren mobilen Proteine. Die Zunahme des Proteingehaltes im Fall der neuralen Stammzellen spricht für eine erhöhte Zellproliferation und einer damit verbundenen Proteinsynthese. Da auch bei den Stammzellen der prozentuale Anteil an lebenden Zellen im Laufe der Messung zurückging, dürfte die Abnahme des Proteingehaltes ebenfalls auf eine Proteolyse zurückzuführen sein. Die konstante Phase in den ersten 30 Stunden würde demnach für ein Gleichgewicht an Proteinsynthese und Proteolyse stehen. Ausgehend von der Zunahme der Zellzahlen in den beiden Fällen mit den neuralen Stammzellen wäre der Anteil mobilen Proteinen pro Zelle deutlich größer bei den behandelten Zellen gewesen. Allerdings sind die berechneten Zellzahlen von einer konstanten Sauerstoffverbrauchsrate abhängig und die könnte sich im Falle einer Ausdifferenzierung der Zellen verändert haben. Für eine genaue Analyse müsste in weiteren Messungen die tatsächliche Zellzahl sowie der Anteil an ausdifferenzierten Zellen bestimmt werden. Zudem müsste die Sauerstoffverbrauchsrate der ausdifferenzierten Zellen ermittelt werden.

Der mittlere Sauerstoffverbrauch war zu Beginn der Messungen im Fall der Tumorzellen etwas größer als bei den Stammzellen, was hauptsächlich an dem starken Sauerstoffverbrauch bei dem Hypoxie-Versuch lag. Ohne Betrachtung dieser Messung wäre der mittlere Sauerstoffverbrauch zu Beginn der Messungen bei den Glioblastom-Zellen bei 6,1 % O_2 und bei den neuralen Stammzellen bei 5,8 % O_2 gelegen, was für einen ähnlichen Sauerstoffverbrauch sprechen würde. Gegen Ende der Messungen nach etwa drei Tagen lag der mittlere Sauerstoffverbrauch bei den Stammzellen dagegen mit 4,9 % O_2 etwas höher als bei den Tumorzellen (3,6 % O_2). Dies lag zum einen an den für die Tumorzellen ungünstigen Bedingungen auf Grund des Mangels an Serum, der Hypoxie oder des pH-Stresses und zum anderen an der Proliferation der Stammzellen.

Die mittlere Sauerstoffverbrauchsrate lag bei den Glioblastom-Zellen unter physiologischen pH-Wert und normoxischen Bedingungen, bei $18,1 \mu\text{mol } O_2 / (l \cdot 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen})$ ($n = 12$) und im Falle der neuralen Stammzellen bei $10,0 \mu\text{mol } O_2 / (l \cdot 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen})$ ($n = 2$). Demnach wäre der Sauerstoffbedarf der Tumorzellen fast doppelt so hoch gewesen, als bei den Stammzellen. Die Dauer eines Zellzyklus betrug dabei sowohl bei den neuralen Stammzellen als auch bei den Glioblastom-Zellen in Kultur ca. 36 Stunden. Aber auch hier ist zu erwähnen, dass die

Tumorzellen in der Perfusionskammer ohne das Serum keine optimalen Bedingungen hatten. Möglicherweise wäre die Sauerstoffverbrauchsrate unter proliferativen Bedingungen daher sogar etwas größer gewesen. Allerdings ist die Sauerstoffverbrauchsrate auch stark von der tatsächlichen Anzahl verbrauchender Zellen abhängig. Die hier ermittelten Verbrauchsdaten ergaben sich aus dem Zellvitalitätstest vor der Messung und dem ersten konstanten Sauerstoffgehalt, der zu Beginn gemessen wurde. Da das Medium vor dem Anschließen der Perfusionskammer einen Sauerstoffgehalt von 21,0 % O₂ hatte und die Perfusionsrate nur 100 µl/min betrug, dauerte dies allerdings einige Stunden. Es ist also zu erwarten, dass sich in dieser Zeit die Anzahl an lebenden Zellen bereits verändert hatte und je nach Dauer bis zum Erreichen eines konstanten Wertes war die Abweichung unterschiedlich groß. Daher kann dieser Vergleich nur als Näherung betrachtet werden.

Bei der Betrachtung des Verlaufs des Sauerstoffverbrauchs zeigte sich eine nahezu lineare Abnahme im Fall der Tumorzellen unter normoxischen Bedingungen ([Abbildung 4.15](#), Seite 83), aber eine deutlich stärkere, nichtlineare Abnahme im Falle eines sauren oder basischen pH-Stresses, wodurch sich klar Auswirkungen auf die Zellvitalität ergaben ([Abbildung 4.32](#), Seite 127). Bei den neuronalen Stammzellen nahm der Sauerstoffverbrauch dagegen nur minimal ab und zeigte ein konstantes Verhalten in der zweiten Hälfte der Messung ([Abbildung 4.24](#), Seite 108 und [Abbildung 4.27](#), Seite 116). Zusammen mit dem prozentualen Anteil an vitalen Zellen am Ende der Messung spricht dies für eine Proliferation im Laufe der Messung. Insgesamt nahm der Sauerstoffverbrauch bei den Stammzellen nur um 6% im unbehandelten, beziehungsweise 30 % im behandelten Fall ab und bei den Glioblastom-Zellen unter Normoxie um 47 %.

In [Abbildung 5.4](#) ist das Verhältnis des Glukose-Verbrauchs zur Laktat-Synthese für die Perfusionsmessungen dargestellt. Dazu wurden die gemessenen Stoffmengen pro Zeit von Glukose und Laktat im Vergleich zum Medium ins Verhältnis gesetzt. Da aus einem Mol Glukose die doppelte Menge Laktat verstoffwechselt werden können, läge das Verhältnis bei einer kompletten Umwandlung dementsprechend bei einem Faktor von 0,5. Die in [Abbildung 5.4](#) teilweise auftretenden kleineren Verhältnisse stammten möglicherweise von erhöhten Laktat-Stoffmengen im Messbereich der Perfusionskammer, welche durch erhöhte Syntheseraten, oder hohen Zelldichten verursacht wurden. Das Verhältnis des Glukose-Verbrauchs zur Laktat-Synthese könnte aber auch andere zelluläre Prozesse wie zum Beispiel der Glutaminolyse, oder auch durch Glukoneogenese beeinflusst worden sein. Die Laktat-Synthese könnte prinzipiell auch zusätzlich durch im Medium enthaltenes Pyruvat beeinflusst worden sein. Eine genaue Analyse wurde in [Kapitel 4.5](#) durchgeführt und zeigte vor allem für die neuronalen Stammzellen auf Grund des geringen Pyruvat-Verbrauchs keine bedeutende Beeinflussung des Verlaufs.

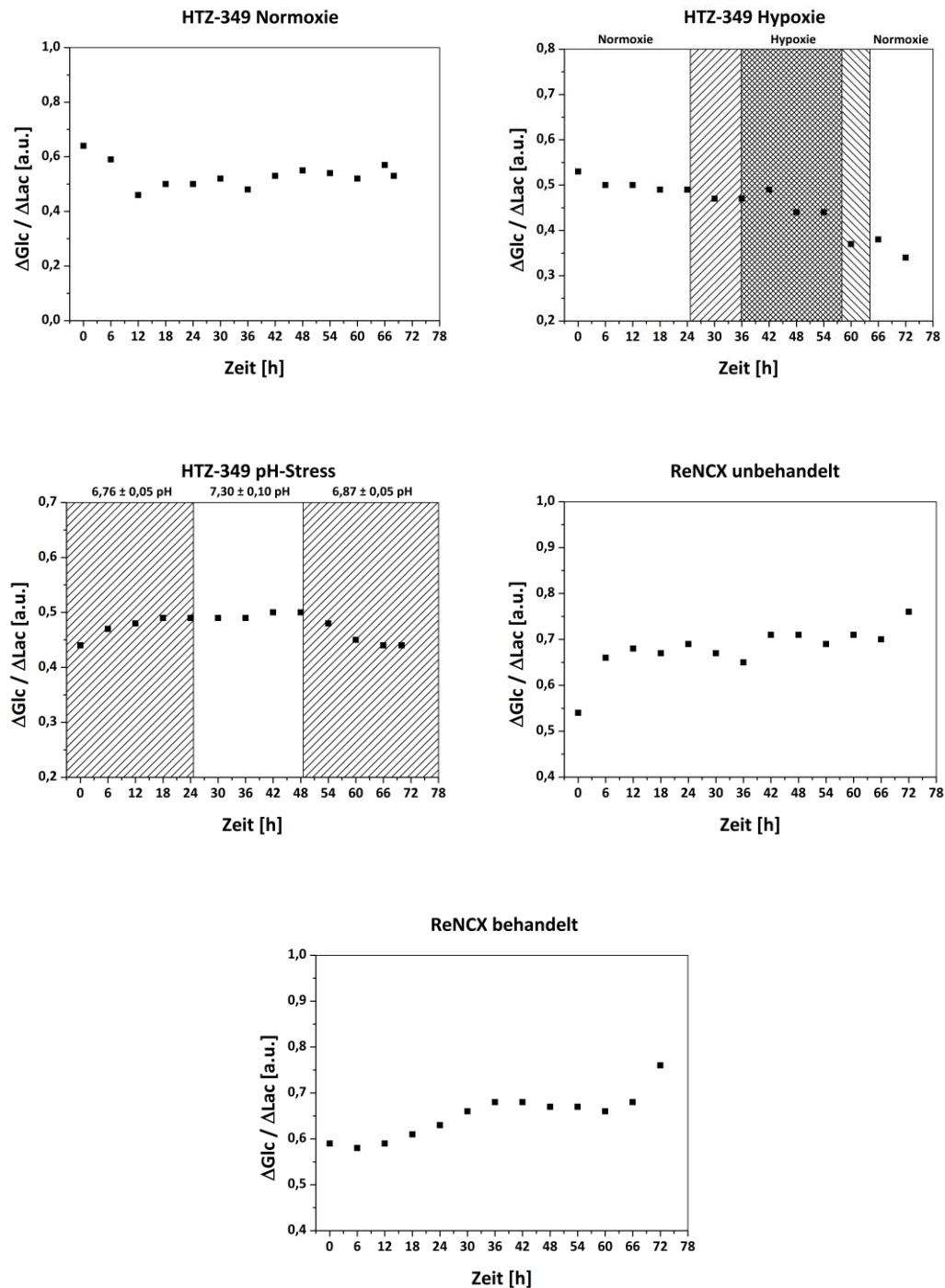


Abbildung 5.4 Verlauf des Verhältnisses aus Glukose-Verbrauch und Laktat-Synthese für die Messungen mit der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 und der humanen neuralen Stammzelllinie ReNCX. Gezeigt ist das Verhältnis des ermittelten Verbrauchs an Glukose und der Laktat-Synthese in der Perfusionskammer im zeitlichen Verlauf. Auf Grund der Tatsache, dass aus einem Mol Glukose maximal zwei Mol Laktat synthetisiert werden können, würde eine komplette Umwandlung den Faktor 0,5 ergeben.

Wie erwartet lag das Verhältnis des Glukose-Verbrauchs zur Laktat-Synthese der neuralen Stammzellen bei deutlich höheren Werten als das der Tumorzellen. Laktat dient dabei als Marker für den Anteil an anaerober Glykolyse. Für die Glioblastom-Zellen unter Normoxie wird deutlich, dass zu Beginn etwas mehr Glukose für andere zelluläre Prozesse verbraucht

wurde, was auf einen metabolisch aktiveren Zustand zu Beginn der Messung schließen lässt. Die Messung unter Hypoxie zeigte wie erwartet, dass der Anteil der Glukose, welcher zu Laktat umgewandelt wurde, unter Sauerstoffmangel zugenommen hatte. Auch pH-Stress führte zu einer vermehrten Laktat-Synthese. Die neuronalen Stammzellen zeigten beide einen schwankenden Verlauf, aber tendenziell nahm das Verhältnis im Laufe der Messung zu. Zu Beginn war das Verhältnis bei den behandelten Stammzellen etwas niedriger und nach 72 Stunden lag es bei beiden Messungen auf gleichem Niveau. Im Schnitt war das Verhältnis dabei im Fall der unbehandelten Zellen minimal höher. Zusammengefasst spricht die Zunahme des Verhältnisses in beiden Fällen für eine Zunahme der metabolischen Aktivität.

5.5 Charakterisierung der mobilen Proteine der Zelllinie HTZ-349 durch ^{15}N -Markierung

Durch die Verwendung von ^{15}N -markierten Aminosäuren nach einer 5-tägigen Kultivierung der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 konnten einige markante Resonanzen der mobilen Proteine im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum nachgewiesen werden ([Abbildung 4.34](#), Seite 130). Ein Vergleich mit den ^{15}N -markierten Aminosäuren zeigte eine deutliche Änderung der chemischen Verschiebungen der Signale. Dies spricht für einen Einbau der markierten Aminosäuren in die Proteinstruktur und einer damit einhergehenden Änderung der chemischen Umgebung. Da das verwendete ISOGRO- ^{15}N Powder-Growth Medium laut Angabe des Herstellers Aminosäuren und Peptide enthielt, zeigte das HSQC-Spektrum des markierten Mediums auch mehr Resonanzen als markierte Aminosäuren im Medium enthalten waren.

Der Vergleich mit Modelpeptiden ergab als mögliche Zuordnungen für die Resonanzen mit den stärksten Intensitäten die Aminosäuren Alanin, Glycin, Leucin, Lysin, Serin und Glutamin. Kauppinen et al. [Kauppinen et al. 1992; Kauppinen et al. 1992; Kauppinen et al. 1993] und Kauppinen & Palvimo [Kauppinen & Palvimo 1992] konnten aus Säureextrakten des cerebralen Cortex von Meerschweinchen und Ratten einen hohen Anteil an den Proteinen Thymosin $\beta 4$ und Histon H1 feststellen, welche in 1D ^1H -NMR-Spektren ebenfalls die typischen makromolekularen Resonanzen der mobilen Proteine zeigten. Weitere von ihnen untersuchten Proteine in diesem Zusammenhang waren Thymosin $\beta 10$, Prothymosin α , HMG 17 und Ubiquitin. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen dieser Proteine mit den prozentualen Anteilen der aus der HSQC-Zuordnung ermittelten Aminosäuren zeigte die höchste Übereinstimmung für die Isoformen des Histon H1 ([Tabelle 4.23](#), Seite 132).

Kauppinen et al. [Kauppinen et al. 1992; Kauppinen et al. 1993] folgerten auf Grund der Lokalisation im Zytosol und der geringeren Größe des Proteins (ca. 5 kDa), dass die mobilen Proteinresonanzen hauptsächlich von Thymosin $\beta 4$ stammten. Im Vergleich mit den Aminosäuresequenzen ergab sich in dieser Arbeit allerdings eine höhere Übereinstimmung mit Histon H1. Jedoch sind die Isoformen des Histon H1 mit im Schnitt 22 kDa tatsächlich deutlich größer und sie sind lokal auf den Zellkern beschränkt. Auf Grund einer notwenigen

Beweglichkeit zur Detektion mittels der NMR-Spektroskopie ist es daher deutlich unwahrscheinlicher, dass die mobilen Proteinresonanzen von Histon H1 stammen. Auch Behar & Ogino [Behar & Ogino 1993] vermuteten die Lokalisation der mobilen Proteine im Zytosol der Zellen.

Es ist klar, dass die Säureextraktionen der verschiedenen Forschungsgruppen und der hier durchgeführte Versuch der Zuordnung anhand einzelner markanter Proteinresonanzen nur als erster Anhaltspunkt dienen können. Die ^{15}N -Markierung der NMR-sichtbaren Proteine bildet daher den ersten Schritt, um in weiteren Versuchen mit doppelt Isotopen-markierten Medium (^{13}C und ^{15}N) eine genaue Zuordnung der Resonanzen durchführen zu können. Der Versuch der Zuordnung der HSQC-Resonanzen mit der ^{15}N -Markierung über den Vergleich mit verschiedenen Modelpeptiden ist natürlich fehlerbehaftet. Das liegt daran, dass die Aminosäuren je nach chemischer Umgebung unterschiedliche chemische Verschiebungen zeigen. So kann der Austausch von einer benachbarten Aminosäure in einem Peptid bereits zu deutlich veränderten chemischen Verschiebungen der untersuchten Aminosäure führen [Wishart et al. 1995]. Daher konnte auch bei zwei markanten Resonanzen im HSQC-Spektrum keine eindeutige Zuordnung durchgeführt werden. Die Abweichungen zu den chemischen Verschiebungen die Modelpeptide waren in diesen Fällen für Leucin und Lysin relativ ähnlich.

Dennoch konnte durch die ^{15}N -Markierung die benötigte Konzentration an markierten Aminosäuren und die optimale Dauer der Kultivierung in diesem Medium bestimmt werden um eine optimale Signalausbeute zu erhalten, was als Ausgangspunkt für weitere Experimente verwendet werden kann. Seit den 1990er Jahren wurden im Bereich der NMR-sichtbaren mobilen Proteine hauptsächlich Methoden untersucht die makromolekularen Resonanzen aus den 1D ^1H -Spektren zu subtrahieren um die Genauigkeit der metabolischen Analysen zu verbessern. Eine genaue Charakterisierung der NMR-sichtbaren mobilen Proteine könnte dabei neue Einblicke in den Zellmetabolismus von den Stammzellen bis hin zu den Tumorzellen geben.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein Perfusions-System an einem hochauflösenden 800 MHz-NMR-Spektrometer etabliert, welches eine metabolische Analyse lebender Zellen über einen mehrtägigen Zeitraum ermöglicht. Durch die Verwendung gasdichter Materialien konnte ein System geschaffen werden, welches trotz einer gesamten Länge des Leitungssystems von 27,6 m eine minimale Sauerstoffkonzentration von bis zu 0,2 % O₂ in der Perfusionskammer ermöglicht. Durch die kontinuierliche Optimierung der Probenvorbereitung und der Sterilisationsmethoden konnte eine mehrtägige Messung im Perfusions-System unter sterilen Bedingungen gewährleistet werden. Über die Veränderung der chemischen Verschiebung der Histidin-Resonanzen H^{δ2} und H^{ε1} wurde eine kontinuierliche Überwachung des pH-Wertes in der Perfusionskammer etabliert. Der pH-Wert des Mediums kann dabei über die CO₂-Begasung geregelt werden. Dies ermöglicht die Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Werts in der Perfusionskammer. Zusätzlich ist es durch die Variation der CO₂-Begasung möglich den Zellmetabolismus unter verschiedenen pH-Werten zu untersuchen. Dies kann sowohl zur Untersuchung der Auswirkung einer Stressphase auf die Zellen genutzt werden als auch um Bedingungen, wie sie *in vivo* auftreten, zu simulieren. Tumorzellen zeigen zum Beispiel *in vivo* häufig eine saure Umgebung auf Grund einer starken Laktat-Synthese.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Konzepte zur Überwachung des Sauerstoffgehaltes im Medium und des Sauerstoffverbrauchs der Zellen verfolgt. Eine Möglichkeit zur Kontrolle des Sauerstoffgehaltes im Medium ist die sauerstoffbedingte Veränderung der T₁-Relaxationszeit des Hexamethyldisiloxans (HMDSO). Allerdings war dies nur über eine Zeit von 30 Stunden möglich, danach verlor das Sensormolekül auf Grund der Instabilität der Emulsion seine Sensitivität gegenüber dem Sauerstoffgehalt. Das Konzept wurde daher und auf Grund einer zytotoxischen Wirkung bei hohen Konzentrationen nicht weiterverfolgt. Stattdessen wurden optische Sauerstoffsensoren in der Zu- und Ableitung der Perfusionskammer installiert. Wegen der besonders gasdichten Bauweise konnte auf eine technisch aufwändige thermische Isolierung des gesamten Leitungssystems verzichtet werden. Das liegt an der zunehmenden Gaslöslichkeit mit sinkender Temperatur. Die Begasung des Mediums und die Messung in der Perfusionskammer finden bei 37 °C statt, während das Medium auf dem Weg vom Inkubator zur Perfusionskammer auf Raumtemperatur absinkt. Durch die zusätzliche Verwendung von Temperatursensoren am Ort der Sauerstoffmessung kann daher der Sauerstoffgehalt bei 37 °C berechnet werden.

Die Konstruktion einer Injektionseinheit ermöglicht die Zugabe von Additiven in die Perfusionskammer bei einer gleichbleibenden Pump-Rate. Nach abgeschlossener Injektion kann dann nahezu unterbrechungsfrei die Perfusion mit dem Medium fortgesetzt werden. Somit können die Auswirkungen zeitlich begrenzter Behandlungen mit einem Additiv metabolisch untersucht werden. Zudem ist es möglich nach dem Sauerstoffsensor in der Ableitung der Perfusionskammer Proben zu entnehmen. Dies ermöglicht eine zeitaufgelöste metabolische Untersuchung.

Die metabolische Analyse der humanen Glioblastom-Zelllinie HTZ-349 zeigt klar die Vorteile der Verwendung des Perfusions-Systems. Durch die Aufrechterhaltung konstanter normoxischer Bedingungen und eines physiologischen pH-Wertes konnte der Anteil an lebenden Zellen nach 72 Stunden stark erhöht werden. Während im Fall ohne Perfusion nur noch 6 % aller Zellen vital waren ergab sich nach einer 3-tägigen Messung unter Perfusion ein Anteil von 55 % lebender Zellen. Dieser Anteil könnte durch die Verwendung des normalerweise in der Zellkultur zusätzlich zugegebenen fötalen Kälberserums im Perfusionsmedium noch weiter erhöht werden. Auf Grund einer starken Schaumbildung des Serums wurde hier allerdings darauf verzichtet. Eine vergleichende Kultivierung der Glioblastom-Zelllinie in üblichen Zellkulturflaschen ohne Serum ergab nach drei Tagen einen Anteil an lebenden Zellen von lediglich 10 %. Durch den kontinuierlichen Nachschub an frischem Medium und optimaler Sauerstoffversorgung bei physiologischem pH-Wert hat das Perfusions-System deutliche Vorteile gegenüber der Kultur der Zellen in den üblichen Zellkulturflaschen. Die Vergleichsmessung ohne Perfusion zeigte, dass die für Tumorzellen wichtigen Metaboliten der Glykolyse sehr schnell in der Perfusionskammer verbraucht waren. Zudem war der pH-Wert mit im Mittel 6,53 pH auf Grund der hohen Laktat-Synthese deutlich erniedrigt. Die nach Erreichen des Glukose-Minimums in der Perfusionskammer einsetzende Abnahme der NMR-sichtbaren mobilen Lipide spricht für eine Veränderung des Zellmetabolismus von der Glykolyse hin zum Lipidabbau, um den Energiebedarf der Zellen in dieser Stresssituation zu decken.

Die Analyse der Glioblastom-Zelllinie unter einer 22-stündigen hypoxischen Phase zeigte keine starken metabolischen Veränderungen beim Übergang aus der anfänglichen normoxischen Phase. Dies könnte den Warburg-Effekt bestätigen, der besagt, dass Tumorzellen auch unter aeroben Bedingungen hauptsächlich Glykolyse betreiben. Da die Glykolyse an sich keinen Sauerstoff benötigt wäre bei einem Sauerstoffentzug auch keine große Veränderung zu erwarten. Allerdings zeigte sich eine deutliche Reaktion der Zellen im Vergleich der Sauerstoffverbrauchsrate vor und nach der hypoxischen Phase, von anfänglichen $28,1 \mu\text{mol O}_2 / (\text{l} \cdot 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen})$ sank die Verbrauchsrate auf $18,1 \mu\text{mol O}_2 / (\text{l} \cdot 1 \cdot 10^6 \text{ Zellen})$, bei einer Perfusionsrate von $100 \mu\text{l/min}$.

Unter niedrigem pH-Wert zeigten sich dagegen deutliche metabolische Veränderungen der Glioblastom-Zellen. Sowohl der Glukose- und Glutamin-Verbrauch als auch die Laktat-Synthese waren in der sauren Phase im Vergleich zur physiologischen Phase erniedrigt. Zudem zeigte die genaue Analyse des Glutamin-Metabolismus, dass während der sauren Phase Glutamin nahezu ausschließlich in einer zellunabhängigen spontanen Umwandlung zu Pyro-Glutamat verstoffwechselt wurde, während in dem physiologischen Abschnitt deutlich mehr Glutamin verbraucht als Pyro-Glutamat synthetisiert wurde. Die NMR-sichtbaren Proteine und

Lipide zeigten ebenfalls eine markante Beeinflussung durch die Veränderung des pH-Wertes. Der starke Anstieg der mobilen Lipide ging bei Eintritt in eine Phase mit physiologischem pH-Wert in einen leicht abnehmenden Verlauf über. Die mobilen Proteine wiesen dagegen eine geringere Abnahme zu Beginn der physiologischen Phase auf. Insgesamt spricht dies für eine Erholungsphase der Zellen in dem physiologischen Abschnitt der Messung und eine Zunahme der metabolischen Aktivität. Die Analyse des Sauerstoffverbrauchs zeigte ebenfalls klare Auswirkungen eines pH-Stresses auf die Tumorzellen. Unter optimalen Bedingungen nahm der Sauerstoffverbrauch der Glioblastom-Zellen im Laufe der Messung linear ab, was auf eine kontinuierliche Abnahme der Zellvitalität auf Grund des Mangels an Serum schließen lässt. Unter sauren oder basischen pH-Wert nahm der Sauerstoffverbrauch deutlich stärker ab. Für eine gleichbleibende Sauerstoffverbrauchsrate konnte eine gute Korrelation der Zellvitalität und dem Sauerstoffverbrauch nachgewiesen werden. Damit ist es möglich die Zellvitalität während einer Perfusionsmessung abzuschätzen.

Ein weiterer untersuchter Zelltyp waren neurale Stammzellen der Zelllinie ReNCX, welche im Kontext der Behandlung der neurodegenerativen Erkrankung Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) nach der Zugabe eines Antisense Oligonukleotids im Vergleich zum unbehandelten Fall metabolisch untersucht wurden. Die neuronalen Stammzellen konnten auf Grund vorhandener Wachstumsfaktoren im Perfusionsmedium im Gegensatz zu den Glioblastom-Zellen in der Perfusionskammer proliferieren. Dies resultierte in einem nahezu gleichbleibenden Sauerstoffverbrauch, obwohl auch hier über 72 Stunden die Zellvitalität auf ca. 65 % abnahm. Zudem lag hier der Anteil an Glukose, der nicht für die Laktat-Synthese verwendet wurde, deutlich höher als bei den Tumorzellen. Die deutlichsten Unterschiede zu den Tumorzellen ergaben sich bei dem Verlauf der mobilen Proteine und Lipide. Zum einen stieg der Anteil an NMR-sichtbaren mobilen Proteinen zu Beginn an und blieb trotz Abnahme im Laufe der Messung über die gesamte Dauer über dem Ausgangsniveau, während bei den Glioblastom-Zellen eine kontinuierliche Abnahme festgestellt wurde. Zum anderen stiegen die mobilen Lipide in den ersten 30 Stunden an und erreichten dann ein konstantes Niveau. Die Tumorzellen zeigten hier unter Normoxie hauptsächlich einen stetigen Anstieg. Zudem nahm das Verhältnis der Methylen- zur Methylgruppe (ML2/ML1), ein Maß für den Anteil an apoptotischen Zellen, im Gegensatz zu den Messungen mit den Glioblastom-Zellen nur geringfügig zu. Der Vergleich der mit Antisense Oligonukleotid behandelten neuronalen Stammzellen mit den unbehandelten Zellen zeigte ebenfalls hauptsächlich Unterschiede in den makromolekularen Resonanzen. Dabei waren im behandelten Fall sowohl der Protein- als auch der Lipidanteil deutlich erhöht, allerdings war der Sauerstoffverbrauch dagegen eindeutig geringer. Dies könnte durch eine Ausdifferenzierung der neuronalen Stammzellen erklärbar sein, da das Antisense Oligonukleotid die Proliferationsrate erhöht und die Zellen mehr zur Ausdifferenzierung bewegt. Weitere Untersuchungen sind hier notwendig um ein klares Ergebnis zu erhalten.

Außerdem wurde in dieser Arbeit versucht erste Schritte in Richtung der Charakterisierung der NMR-sichtbaren mobilen Proteine zu unternehmen. Diese makromolekularen Resonanzen sind schon lange bekannt, aber es wurden nur wenig Versuche unternommen die Resonanzen zuzuordnen. In einer Versuchsreihe wurde die Menge an ^{15}N -markierten Aminosäuren sowie die Kulturdauer ermittelt, bei der die Signalausbeute im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum am größten war. Es wurde versucht die stärksten Resonanzen über Vergleiche mit

Modelpeptiden einzelnen Aminosäuren zuzuordnen, in der Hoffnung eine dominante Aminosäuresequenz zu ermitteln, von welcher man auf mögliche Proteine schließen könnte. Als Vergleichsgrundlage wurden die in der Literatur vorgeschlagenen Proteine verwendet. Ein klares Ergebnis konnte daraus nicht gefolgert werden, allerdings ist die Vorarbeit mit der ^{15}N -Markierung ein guter Ausgangspunkt um weitere Untersuchungen durchzuführen.

Es konnte gezeigt werden, dass das entwickelte Perfusions-System ein breites Spektrum von Anwendungsmöglichkeiten für unterschiedliche Zelltypen bietet. Durch eine weitere Optimierung des Systems im Bereich der Zellimmobilisation, der Fraktionssammlung und des Injektionssystems könnte die Genauigkeit der metabolischen Analyse weiter erhöht werden. Das Perfusions-System kann somit unter anderem dazu beitragen den Metabolismus von Stamm- und Tumorzellen besser zu verstehen und Biomarker zur Unterscheidung verschiedener Zelltypen oder einen Behandlungserfolg zu generieren.

7 Literatur

- Ackerman, J.J.H., Soto, G.E., Spees, W.M., Zhu, Z. & Evelhoch, J.L., 1996. The NMR Chemical Shift pH Measurement Revisited: Analysis of Error and Modeling of a pH Dependent Reference. *Magnetic Resonance in Medicine*, 36(5), 674-683.
- Aigner, L. & Bogdahn, U., 2008. TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell and Tissue Research*, 331(1), 225-241.
- Alfarouk, K.O., 2016. Tumor metabolism, cancer cell transporters, and microenvironmental resistance. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 859-866.
- Arslan, F., Bosserhoff, A., Nickl-Jockschat, T., Doerfelt, A., Bogdahn, U. & Hau, P., 2007. The role of versican isoforms V0/V1 in glioma migration mediated by transforming growth factor- β 2. *British Journal of Cancer*, 96(10), 1560–1568.
- Behar, K.L., Rothman, D.L., Spencer, D.D. & Petroff, O.A.C., 1994. Analysis of Macromolecule Resonances in ^1H NMR Spectra of Human Brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, 32(3), 294-302.
- Behar, K.L. & Ogino, T., 1991. Assignment of Resonances in the ^1H NMR Spectrum of Rat Brain by Two-Dimensional Shift Correlated and J-Resolved NMR Spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, 17(2), 285-303.
- Behar, K.L. & Ogino, T., 1993. Characterization of Macromolecule Resonances in the ^1H NMR Spectrum of Rat Brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, 30(1), 38-44.
- Beloribi-Djefaflija, S., Vasseur, S. & Guillaumond, F., 2016. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*, 5, 1-10.
- Birch, R., Peet, A.C., Dehghani, H. & Wilson, M., 2017. Influence of Macromolecule Baseline on ^1H MR Spectroscopic Imaging Reproducibility. *Magnetic Resonance in Medicine*, 77(1), 34-43.
- Block, S.S., 2001. Disinfection, Sterilization, and Preservation, Fifth edition, *Lippincott Williams & Wilkins*, ISBN: 0683307401.
- Bogdahn, U., Apfel, R., Hahn, M., Gerlach, M., Behl, C., Hoppe, J. & Martin, R., 1989. Autocrine Tumor Cell Growth-inhibiting Activities from Human Malignant Melanoma. *Cancer Research*, 49(19), 5358-5363.

- Burt, C.T., Cohen, S.M. & Bárány, M., 1979. Analysis of intact tissue with ^{31}P NMR. *Annual Review of Biophysics*, 8, 1-25.
- Callies, R., Sri-Pathmanathan, R.M., Ferguson, D.Y.P. & Brindle, K.M., 1993. The Appearance of Neutral Lipid Signals in the ^1H NMR Spectra of a Myeloma Cell Line Correlates with the Induced Formation of Cytoplasmic Lipid Droplets. *Magnetic Resonance in Medicine*, 29(4), 546-550.
- Carr, H.Y. & Purcell, E.M., 1954. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Physical Review*, 94(3), 630-638.
- Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., Palmer III, A.G., Rance, M. & Skelton, N.J., 2007. Protein NMR Spectroscopy – Principles and Practice, Second edition. *Elsevier Academic Press*, ISBN: 012164491X.
- Chen, J., Li, Y., Yu, T.S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G. & Parada, L.F., 2012. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 488, 522-526.
- Chen, K., Ng, C.E., Zweier, J.L., Kuppusamy, P., Glickson, J.D. & Swartz, H.M., 1994. Measurement of the Intracellular Concentration of Oxygen in a Cell Perfusion System. *Magnetic Resonance in Medicine*, 31(6), 668-672.
- Daly, P.F., Lyon, R.C., Faustino, P.J. & Cohen, J.S., 1987. Phospholipid Metabolism in Cancer Cells Monitored by ^{31}P NMR Spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(31), 14875-14878.
- Darmady, E.M., Hughes, K.E.A., Jones, J.D., Prince, D. & Tuke W., 1961. Sterilization by dry heat. *Journal of Clinical Pathology*, 14(1), 38-44.
- Dawson, M.J., Gadian, D.G. & Wilkie, D.R., 1977. Contraction and recovery of living muscles studied by ^{31}P nuclear magnetic resonance. *The Journal of Physiology*, 267(3), 703-735.
- DeBerardinis, R.J., Sayed, N., Ditsworth, D. & Thompson, C.B., 2008. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18(1), 54-61.
- De Filippis, L. & Binda, E., 2012. Concise Review: Self-Renewal in the Central Nervous System: Neural Stem Cells from Embryo to Adult. *Stem Cells Translational Medicine*, 1(4), 298-308.
- De Graaf, R.A., 2007. In vivo NMR Spectroscopy – Principles and Techniques, Second edition, *John Wiley & Sons Ltd*, ISBN: 9780470026700.
- Delikatny, E.J., Chawla, S., Leung, D.J. & Poptani, H., 2011. MR-visible lipids and the tumor microenvironment. *NMR in Biomedicine*, 24(6), 592-611.
- Di Vito, M., Lenti, L., Knijn, A., Iorio, E., D'Agostino, F., Molinari, A., Calcabrini, A., Stringaro, A., Meschini, S., Arancia, G., Bozzi, A., Strom, R. & Podo, F., 2001. ^1H NMR-visible mobile lipid domains correlate with cytoplasmic lipid bodies in apoptotic T-lymphoblastoid cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1530(1), 47-66.

- Dobner, C., 2011. NMR Spektroskopie an menschlichen Tumorzellen der Zelllinie HTZ-349 unter Perfusion. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Endo, F., Komine, O., Fujimori-Tonou, N., Katsuno, M., Jin, S., Watanabe, S., Sobue, G., Dezawa, M., Wyss-Coray, T. & Yamanaka, K., 2015. Astrocyte-Derived TGF- β 1 Accelerates Disease Progression in ALS Mice by Interfering with the Neuroprotective Functions of Microglia and T Cells. *Cell Reports*, 11(4), 592-604.
- Evers, M.M., Toonen, L.J.A. & van Roon-Mom, W.M.C., 2015. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 90-103.
- Ferretti, A., Knijn, A., Iorio, E., Pulciani, S., Giambenedetti, M., Molinari, A., Meschini, S., Stringaro, A., Calcabrini, A., Freitas, I., Strom, R., Arancia, G. & Podo, F., 1999. Biophysical and structural characterization of ^1H -NMR-detectable mobile lipid domains in NIH-3T3 fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1438(3), 329-348.
- Foxall, D.L. & Cohen, J.S., 1983. NMR Studies of Perfused Cells. *Journal of Magnetic Resonance*, 52(2), 346-349.
- Foxall, D.L., Cohen, J.S. & Mitchell, J.B., 1984. Continuous Perfusion of Mammalian Cells Embedded in Agarose Gel Threads. *Experimental Cell Research*, 154(2), 521-529.
- Garlick, P.B., Radda, G.K. & Seeley, P.J., 1977. Phosphorus NMR studies on perfused heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 74(3), 1256-1262.
- Gatenby, R.A. & Gillies, R.J., 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, 4(11), 891-899.
- Gilbert, J.B., Price, V.E. & Greenstein, J.P., 1949. Effect of anions on the non-enzymatic desamidation of glutamine. *The Journal of Biological Chemistry*, 180(1), 209-218.
- Glunde, K., Bhujwalla, Z.M. & Ronen, S.M., 2011. Choline metabolism in malignant transformation. *Nature Reviews Cancer*, 11(12), 835-848.
- Gonzalez-Mendez, R., Wemmer, D., Hahn, G., Wade-Jardetzky, N. & Jardetzky, O., 1982. Continuous-flow NMR culture system for mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 720(3), 274-280.
- Gross, J.D., Long Jr., R.C., Constantinidis, I. & Sambanis, A., 2007. Monitoring of Dissolved Oxygen and Cellular Bioenergetics Within a Pancreatic Substitute. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(1), 261-270.
- Gulaka, P.K., Rastogi, U., McKay, M.A., Wang, X., Mason, R.P. & Kodibagkar, V.D., 2011. Hexamethyldisiloxane-based nanoprobe for ^1H MRI oximetry. *NMR in Biomedicine*, 24(10), 1226-1234.
- Hakumäki, J.M. & Kauppinen, R.A., 2000. ^1H NMR visible lipids in the life and death of cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(8), 357-362.
- Homem, C.C.F., Repic, M. & Knoblich, J.A., 2015. Proliferation control in neural stem and progenitor cells. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(11), 647-659.

- Jacobson, L. & Cohen, J.S., 1981. Improved technique for investigation of cell metabolism by ^{31}P NMR spectroscopy. *Bioscience Reports*, 1(2), 141-150.
- Jen, A.C., Wake, M.C. & Mikos, A.G., 1996. Review: Hydrogels for Cell Immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(4), 357-364.
- Kahlert, U.D., Mooney, S.M., Natsumeda, M., Steiger, H.J. & Maciaczyk, J., 2017. Targeting cancer stem-like cells in glioblastoma and colorectal cancer through metabolic pathways. *International Journal of Cancer*, 140(1), 10-22.
- Kang, A., Park, J., Ju, J., Jeong, G.S. & Lee, S.H., 2014. Cell encapsulation via microtechnologies. *Biomaterials*, 35(9), 2651-2663.
- Kauppinen R.A., Kokko, H. & Williams, S.R., 1992. Detection of Mobile Proteins by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in the Guinea Pig Brain Ex Vivo and Their Partial Purification. *Journal of Neurochemistry*, 58(3), 967-974.
- Kauppinen, R.A., Niskanen, T. & Hakumäki, J., 1993. Quantitative Analysis of ^1H NMR Detected Proteins in the Rat Cerebral Cortex *In Vivo* and *In Vitro*. *NMR in Biomedicine*, 6(4), 242-247.
- Kauppinen, R.A., Nissinen, T., Kärkkäinen A.M., Pirttilä, T.R.M., Palvimo, J., Kokko, H. & Williams, S.R., 1992. Detection of Thymosin $\beta 4$ *in Situ* in a Guinea Pig Cerebral Cortex Preparation Using ^1H NMR Spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(14), 9905-9910.
- Kauppinen R.A. & Palvimo, J., 1992. Contribution of Cytoplasmic Polypeptides to the ^1H NMR Spectrum of Developing Rat Cerebral Cortex. *Magnetic Resonance in Medicine*, 25(2), 398-407.
- Kodibagkar, V.D., Cui, W., Merritt, M.E. & Mason, R.P., 2006. Novel ^1H NMR Approach to Quantitative Tissue Oximetry Using Hexamethyldisiloxane. *Magnetic Resonance in Medicine*, 55(4), 743-748.
- Kodibagkar, V.D., Wang, X. & Mason, R.P., 2008. Physical principles of quantitative nuclear magnetic resonance oximetry. *Frontiers in Bioscience*, 13(4), 1371-1384.
- Koehler, J., 2014. Methodische Entwicklungen zur Hochdruck-Kernspinresonanzspektroskopie sowie druckabhängige Untersuchungen an Oozyten von *Xenopus laevis* und Modellpeptiden. Dissertation, Universität Regensburg.
- Koehler, J., Beck Erlach, M., Crusca Jr., E., Kremer, W., Munte, C.E. & Kalbitzer, H.R., 2012. Pressure Dependence of ^{15}N Chemical Shifts in Model Peptides Ac-Gly-Gly-X-Ala-NH₂. *Materials*, 5(10), 1774-1786.
- Kumar, A. & Bachhawat, A.K., 2012. Pyroglutamic acid: throwing light on a lightly studied metabolite. *Current Science*, 102(2), 288-297.
- Levitt, M.H., 2008. Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance, Second edition, John Wiley & Sons Ltd, ISBN: 9780470511183.

- Luciani, A.M., Grande, S., Palma, A., Rosi, A., Giovannini, C., Sapora, O., Viti, V. & Guidoni, L., 2009. Characterization of ^1H NMR detectable mobile lipids in cells from human adenocarcinomas. *FEBS Journal*, 276(5), 1333-1346.
- Lundberg, P., Berners-Price, S.J., Roy, S. & Kuchel, P.W., 1992. NMR Studies of Erythrocytes Immobilized in Agarose and Alginate Gels. *Magnetic Resonance in Medicine*, 25(2), 273-288.
- Lundberg, P., Roy, S. & Kuchel, P.W., 1994. Immobilization Methods for NMR Studies of Cellular Metabolism – A Practical Guide. *ImmunoMethods*, 4(2), 163-178.
- Lunt, S.Y. & Vander Heiden, M.G., 2011. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 441-464.
- Lyon, R.C., Faustino, P.J. & Cohen, J.S., 1986. A Perfusion Technique for ^{13}C NMR Studies of the Metabolism of ^{13}C -Labeled Substrates by Mammalian Cells. *Magnetic Resonance in Medicine*, 3(5), 663-672.
- Mancuso, A., Beardsley, N.J., Wehrli, S., Pickup, S., Matschinsky, F.M. & Glickson, J.D., 2004. Real-Time Detection of ^{13}C NMR Labeling Kinetics in Perfused EMT6 Mouse Mammary Tumor Cells and βHC9 Mouse Insulinomas. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(7), 835-848.
- Massirer, K.B., Carromeu, C., Griesi-Oliveira, K. & Muotri, A.R., 2011. Maintenance and differentiation of neural stem cells. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 3(1), 107-114.
- Maugeri-Saccà, M., Di Martino, S. & De Maria, R., 2013. Biological and clinical implications of cancer stem cells in primary brain tumors. *Frontiers in Oncology*, 3(Article 6), 1-10.
- Mayers, J.R. & Vander Heiden, M.G., 2015. Famine versus feast: understanding the metabolism of tumors in vivo. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(3), 130-140.
- McKay, R.T., 2011. How the 1D-NOESY Suppresses Solvent Signal in Metabonomics NMR Spectroscopy: An Examination of the Pulse Sequence Components and Evolution. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 38A(5), 197-220.
- Meiboom, S. & Gill, D., 1958. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *The Review of Scientific Instruments*, 29(8), 688-691.
- Morrison, S.J., Shah, N.M. & Anderson, D.J., 1997. Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. *Cell*, 88(3), 287-298.
- Mountford, C.E. & Wright, L.C., 1988. Organization of lipids in the plasma membranes of malignant and stimulated cells: a new model. *Trends in Biochemical Sciences*, 13(5), 172-177.
- Ng, C.E., McGovern, K.A., Wehrle, J.P. & Glickson, J.D., 1992. ^{31}P NMR Spectroscopic Study of the Effects of γ -Irradiation on RIF-1 Tumor Cells Perfused *in Vitro*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 27(2), 296-309.

- Oburoglu, L., Tardito, S., Fritz, V., De Barros, S.C., Merida, P., Craveiro, M., Mamede, J., Cretenet, G., Mongellaz, C., An, X., Klysz, D., Touhami, J., Boyer-Clavel, M., Battini, J.L., Dardalhon, V., Zimmermann, V.S., Mohandas, N., Gottlieb, E., Sitbon, M., Kinet, S. & Taylor, N., 2014. Glucose and Glutamine Metabolism Regulate Human Hematopoietic Stem Cell Lineage Specification. *Cell Stem Cell*, 15(2), 169-184.
- Opstad, K.S., Bell, B.A., Griffiths, J.R. & Howe, F.A., 2008. Toward Accurate Quantification of Metabolites, Lipids and Macromolecules in HRMAS Spectra of Human Brain Tumor Biopsies Using LCMODEL. *Magnetic Resonance in Medicine*, 60(5), 1237-1242.
- Pelta, M.D., Morris, G.A., Stchedroff, M.J. & Hammond, S.J., 2002. A one-shot sequence for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 40(13), S147-S152.
- Pernodet, N., Maaloum, M. & Tinland, B., 1997. Pore size of agarose gels by atomic force microscopy. *Electrophoresis*, 18(1), 55-58.
- Podo, F., 1999. Tumour phospholipid metabolism. *NMR in Biomedicine*, 12(7), 413-439.
- Popov, K., Rönkkömäki, H. & Lajunen, L.H.J., 2006. Guidelines for NMR measurements for determination of high and low pK_a values. *Pure and Applied Chemistry*, 78(3), 663-675.
- Quintero, M.R., Cabañas, M.E. & Arús, C., 2007. A possible cellular explanation for the NMR-visible mobile lipid (ML) changes in cultured C6 glioma cells with growth. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771(1), 31-44.
- Rabenstein, D.L. & Isab A.A., 1982. Determination of the Intracellular pH of Intact Erythrocytes by ¹H NMR Spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 121(2), 423-432.
- Ramm, P., 2011. High Field ¹H-NMR Spectroscopy on Cell Suspensions of Neural Progenitor Cells and Brain Tumor-Initiating Cells. Dissertation, Universität Regensburg.
- Ramm, P., Bettscheider, M., Beier, D., Kalbitzer, H.R., Kremer, W., Bogdahn, U., Hau, P., Aigner, L. & Beier, C.P., 2011. ¹H-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Glioblastoma Cancer Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 20(12), 2189-2195.
- Ramm Sander, P., Hau, P., Koch, S., Schütze, K., Bogdahn, U., Kalbitzer, H.R. & Aigner, L., 2013. Stem cell metabolic and spectroscopic profiling. *Trends in Biotechnology*, 31(3), 204-213.
- Roll, L. & Faissner, A., 2014. Influence of the extracellular matrix on endogenous and transplanted stem cells after brain damage. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(Article 219) 1-21.
- Rutala, W.A. & Weber, D.J., 2004. Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities: What Clinicians Need to Know. *Clinical Infectious Diseases*, 39(5), 702-709.
- Schaller, B., Xin, L. & Gruetter, R., 2014. Is the Macromolecule Signal Tissue-Specific in Healthy Human Brain? A ¹H MRS Study at 7 Tesla in the Occipital Lobe. *Magnetic Resonance in Medicine*, 72(4), 934-940.

- Shestov, A.A., Mancuso, A., Lee, S.C., Guo, L., Nelson, D.S., Roman, J.C., Henry, P.G., Leeper, D.B., Blair, I.A. & Glickson, J.D., 2016. Bonded Cumomer Analysis of Human Melanoma Metabolism Monitored by ^{13}C NMR Spectroscopy of Perfused Tumor Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(10), 5157-5171.
- Shyh-Chang, N., Daley, G.Q. & Cantley, L.C., 2013. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development*, 140(12), 2535-2547.
- Sklenář, V., Piotto, M., Leppik, R. & Saudek, V., 1993. Gradient-Tailored Water Suppression for ^1H - ^{15}N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 102(2), 241-245.
- Solary, E., Eymin, B., Droin, N. & Haugg, M., 1998. Proteases, proteolysis, and apoptosis. *Cell Biology and Toxicology*, 14(2), 121-132.
- Swinnen, B. & Robberecht, W., 2014. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 10(11), 661-670.
- Taupin, P. & Gage, F.H., 2002. Adult Neurogenesis and Neural Stem Cells of the Central Nervous System in Mammals. *Journal of Neuroscience Research*, 69(6), 745-749.
- The UniProt Consortium, 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 45(Database issue), D158-D169.
- Tritsch, G.L. & Moore, G.E., 1962. Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media. *Experimental Cell Research*, 28(2), 360-364.
- Tynkkynen, T., Tiainen, M., Soininen, P. & Laatikainen, R., 2009. From proton nuclear magnetic resonance spectra to pH. Assessment of ^1H NMR pH indicator compound set for deuterium oxide solutions. *Analytica Chimica Acta*, 648(1), 105-112.
- Ulrich, E.L., Akutsu, H., Doreleijers, J.F., Harano, Y., Ioannidis, Y.E., Lin, J., Livny, M., Mading, S., Maziuk, D., Miller, Z., Nakatani, E., Schulte, C.F., Tolmie, D.E., Wenger, R.K., Yao, H. & Markley, J.L., 2008. BioMagResBank. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue), D402-D408.
- Vermathen, P., Capizzano, A.A. & Maudsley, A.A., 2000. Administration and ^1H MRS Detection of Histidine in Human Brain: Application to In Vivo pH Measurement. *Magnetic Resonance in Medicine*, 43(5), 665-675.
- Vescovi, A.L., Galli, R. & Reynolds, B.A., 2006. Brain tumour stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 6(6), 425-436.
- Visvader, J.E. & Lindeman, G.J., 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer*, 8(10), 755-768.
- Wagner, B.A., Venkataraman, S. & Buettner, G.R., 2011. The Rate of Oxygen Utilization by Cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(3), 700-712.
- Warburg, O., Posener, K. & Negelein, E., 1924. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem. Zeitschr.*, 152, 309-344.

- Wishart, D.S., Bigam, C.G., Holm, A., Hodges, R.S. & Sykes, B.D., 1995. ^1H , ^{13}C and ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *Journal of Biomolecular NMR*, 5(1), 67-81.
- Wishart, D.S., Bigam, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., Markley, J.L. & Sykes, B.D., 1995. ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *Journal of Biomolecular NMR*, 6(2), 135-140.
- Wishart, D.S., Jewison, T., Guo, A.C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Arndt, D., Xia, J., Liu, P., Yallou, F., Bjorndahl, T., Perez-Pineiro, R., Eisner, R., Allen, F., Neveu, V., Greiner, R. & Scalbert, A., 2013. HMDB 3.0 – The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D801-D807.
- Xia, J., Broadhurst, D.I., Wilson, M. & Wishart, D.S., 2013. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics* 9(2), 280-299.

8 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt...

Prof. Dr. Ulrich Bogdahn für die interessante Themenstellung, die Freiheit der Gestaltung meiner Dissertation und für die vielen aufbauenden Gespräche, seinem steten Optimismus und seiner Unterstützung.

Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für die Ermöglichung der Durchführung dieser Dissertation in seinem Institut, die zur Verfügungstellung der Labore und der Messgeräte und den hilfreichen Diskussionen.

Prof. Dr. Peter Hau für die Bereitstellung der Tumorzellen, Medien und Antibiotika und seiner Arbeitsgruppe Neuroonkologie, vor allem Dr. Arabel Vollmann-Zwerenz und Birgit Jachnik für das Kultivieren der Glioblastom-Zellen und der fachlichen Beratung sowie allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundliche Atmosphäre.

Der Arbeitsgruppe Neurodegeneration/ALS, vor allem Dr. Tim-Henrik Bruun für die Hilfsbereitschaft und vielen fruchtbaren Diskussionen, Dr. Sabrina Küspert, Eva Zitzelsperger und Rosemarie Haydn, für die Kultivierung der neuronalen Stammzellen und der fachlichen Beratung.

Prof. Dr. Werner Kremer für die Übernahme des Amtes des ersten Mentors der Graduiertenschule sowie seiner allgemeinen Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Messungen an den NMR-Spektrometern.

Dr. Paul Sander für seine fachliche Unterstützung und der Übernahme des Amtes des Supervisors der Graduiertenschule im ersten Jahr der Dissertation.

Den technischen Assistenten des Lehrstuhls von Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer, meinem Bürokollegen Robert Bobardt für das freundschaftliche Büroklima und seine Hilfe beim Aufbau des Perfusions-Systems, Dörte Repenning-Rochelt für ihre große Hilfsbereitschaft und Simon Peter Grunert für seine Unterstützung bei der kontinuierlichen Versorgung mit Stickstoff.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls von Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für die angenehme Atmosphäre.

Nicht zuletzt bei meiner Familie für die Unterstützung und die aufbauenden Worte bei der Erstellung meiner Dissertation.